

Aus dem Medizinischen Zentrum für Operative Medizin
der Philipps-Universität Marburg
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. P. Griss)
Abteilung für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik
(Leiter: Prof. D.B. Jones Ph.D.M.I.Biol)

**Immortalisierung und Charakterisierung von Zellen
osteoblastischen Phänotypes und die
Mechanismen der Apoptose**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin

Dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg



vorgelegt von
Susanne Melanie Hundt
aus Köln

Marburg 2000

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
am:

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. F. Kern
Referent:	Prof. D.B. Jones Ph.D.M.I.Biol
Correferent:	Prof. Dr. R. Moll

**Meinen Eltern
und
Großeltern**

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

1.1	Der Knochen und die Osteogenese	6
1.1.1	Die unterschiedlichen Zellen des Knochens	11
1.1.2	Morphologie und biochemische Charakteristika des Osteoblasten im Speziellen.....	14
1.2	Die Mechanotransduktion und die Prinzipien der Dehnung	19
1.3	Signalweiterleitung zum Kern über die Adenylat-Zyklase-Kaskade und die Inositid-Phosphat-Kaskade mit Beschreibung der Phospholipase C (PLC) im Besonderen	24
1.4	Transformierte humane Osteoblasten (THO) und die Immortalisierung mit dem Simian Virus 40.....	30
1.5	Die Zusammenhänge verschiedener initiiender und inhibierender Faktoren in der Apoptose	33
1.6	Aufgabenstellung	41

2. Material und Methode

2.1	Materialien und Untersuchungsgut	43
2.1.1	Zellisolierung und Zellkultur.....	43
2.1.2	Splitten der Zellen	46
2.1.3	Ablösen und Einfrieren der Zellen	47
2.1.4	Auftauen der Zellen, Zellzahlbestimmung und das Aussetzen der Zellen	48
2.2	Methoden	50
2.2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	50
2.2.2	Dehnungsapparatur, Dehnungsvorgang, MTT-Test.....	51
2.2.3	Immunzytochemischer AK-Test	55
2.2.4	Trypanblaufärbe-Test.....	58
2.2.5	Northern-Blot Analyse.....	59
2.2.6	Lyse und Extraktion der Proteine, Western-Blot Analyse mit Bradford Protein Assay und immunzytochemischem Nachweis von Proteinen auf der Blotmembran.....	64

3.	Ergebnisse	
3.1	Analyse des immunzytochemischen Antikörpertests	75
3.2	Beschreibung des Osteokalzin-Northern-Blots	80
3.3	Darstellung der Vitalität mit der Trypanblaufärbemethode	82
3.4	Ergebnisse und graphische Auswertung der MTT-Messungen	83
3.5	Darstellung des Phospholipase C (PLC)-Verteilungsmusters in THO-Zellen, primären bovinen Osteoblasten, MG-63 Zellen und SaOS-2 Zellen	87
3.6	Dokumentation der morphologischen Veränderungen in der THO-Zelllinie	96
3.7	Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) Detektion als früher Apoptosemarker.....	98
4.	Diskussion.....	101
5.	Zusammenfassung.....	117
6.	Literaturverzeichnis	119
7.	Anhang	134
	a. Lebenslauf.....	134
	b. Verzeichnis der akademischen Lehrer	136
	c. Danksagung	137
	d. Ehrenwörtliche Erklärung	138

1. Einleitung

1.1. Der Knochen und die Osteogenese

Der Knochen ist ein komplexes Netzwerk aus unterschiedlichen Zelltypen in einer definierten extrazellulären Matrix. Die Zellen interagieren untereinander und mit der extrazellulären Matrix. Die Koordination von Proliferation und nachfolgender Differenzierung ist ein wesentliches Charakteristikum für die Entwicklung und Etablierung eines Gewebes (H. Mayer, A. Scutt et al., 1992).

Knochen ist eine spezialisierte Form von Bindegewebe. Beim Knochen kommt es zu einer Kalzifizierung der Zwischenzellsubstanz, was ein entscheidender Hinweis auf die verschiedenen Funktionen des Knochens ist. Er dient zur mechanischen Stütze, der Bewegung, dem Schutz und als Stoffwechselreservoir für Mineralsalze (Stevens et al., 1992). Durch die Verkalkung der Zwischenzellsubstanz erhält der Knochen eine beachtliche Steifigkeit und Bruchfestigkeit, ohne jedoch an Elastizität einzubüßen. Knochen gehört zu den härtesten Substanzen des Körpers, er ist jedoch kein permanentes und unbewegliches Gewebe, da durch seine mineralisierte Matrix Kanäle und Hohlräume mit lebenden Zellen ziehen.

Das Knochengewebe besteht zu 15% aus zellulären Bestandteilen, zu 40% aus organischer Matrix und zu 45% aus anorganischer mineralischer Phase. Den größten Teil davon nimmt mit 90% Hydroxylapatit ein. Die restlichen 10% liegen als Fluorapatit, Carbonatapatit, Kalziumcarbonat und Magnesiumcarbonat vor (Buddecke, E. 1981).

Die Osteogenese ist ein komplexer Vorgang, der nicht nur in der Ontogenese abläuft, sondern auch bei Regeneration nach Knochenbruch und bei der Anpassung des Gewebes an die täglichen Anforderungen. Der Knochen dient dem Körper zum einen als Gerüstsystem und als Muskulaturansatz, zum anderen zur Protektion des Knochenmarks und des Zentralnervensystems.

Mechanische Belastung beeinflusst die Regulation der Knochenmasse und der Knochenstruktur. Sie kann die Proliferation und die Differenzierung der Osteoblasten erhöhen (Brighton et al., 1991; Jones et al., 1991). Auf der anderen Seite kann eine zu hohe Belastung ein Gewebs- und Matrixversagen verursachen und somit Zellen beschädigen, was sich in einer Entzündung äußern kann.

Der Prozeß von anabolischen und katabolischen Vorgängen im Gewebe wird durch mechanische Belastung reguliert im Zusammenhang mit lokalen und systemischen Hormonen um sicherzustellen, daß das Gewebe auf die Forderung der mechanischen Umgebung eingehen kann (Jones et al., 1995). Die Osteogenese beinhaltet eine geordnete Abfolge von Proliferation osteogener Vorläuferzellen und einer nachfolgenden Differenzierung, die zu extrazellulärer Matrix-Reifung und Mineralisation führt (Mayer H., Scutt A. et al., 1992). Die Entwicklung der einzelnen Knochen unterscheidet sich in einigen Details.

Die grundlegenden Schritte der Knochenentwicklung sollen im folgenden kurz dargestellt werden. Die membranöse, embryonale und enchondrale Knochenbildung ist von Caplan und Pechak ; 1987 am Modell der Gliedmaßenentwicklung des Hühnchens eingehend untersucht worden:

Um einen aus Mesenchymzellen hervorgegangenen Knorpelkern legt sich eine 4-6 Zellen starke Schicht von Osteoprogenitorzellen. Die dem Knorpelkern naheliegenden Osteoprogenitorzellen

differenzieren sich zu Osteoblasten. Diese produzieren und sezernieren eine einheitliche Matrix, das Osteoid. Diese Osteoidschicht fungiert als physikalische Barriere und verhindert die Ausdehnung, Sauerstoffversorgung und Ernährung des Knorpelkerns. Die Zellen des Knorpelkerns reagieren hierauf mit Hypertrophie. Es folgt die Mineralisierung der Osteoidschicht und der erste Teil des Knochens ist entstanden. Nun dringen Kapillaren von außerhalb durch die Schicht der Osteoprogenitorzellen und legen sich wie ein Netz auf die bereits gebildete erste Knochenschicht. Die Osteoidbildung und anschließende Mineralisation setzt sich zwischen den Kapillarnetzen und senkrecht zu der gebildeten Knochenschicht fort.

Durch Hypertrophie der Knorpelzellen kommt es zum Stillstand der Bildung eines sogenannten anti-angiogenetischen Faktors durch die zentralen Knorpelzellen. Hierdurch wird die vaskuläre Invasion durch die erste Knochenschicht in den Knorpelkern ermöglicht. Dieses ist die Voraussetzung für die Neubildung von trabekulärem Knochen durch Osteoblasten und den Ersatz der Knorpelzellen durch Knochenmark und Vaskularisierung (Caplan A. & Pechak D., 1987).

Das bei der Osteogenese durch die Osteoblasten sezernierte Osteoid (die organische Knochenmatrix), besteht zum einen aus Proteoglykanen und Glykoproteinen (v.a. Chondroitinsulfat und in geringeren Mengen Hyaluronsäure), der Grundsubstanz des Knochens und weiterhin aus Kollagen I, das in der Grundsubstanz zu Kollagenfibrillen aggregiert.

Die Matrix enthält über 200 Proteine. Diese lassen sich nach funktionellen Aspekten in zwei Gruppen einteilen:

- die Strukturproteine: das Hauptstrukturprotein ist das Kollagen, welches einen Anteil von über 90% der organischen Matrix stellt. Hiervon hat das Kollagen I den größten Anteil, aber auch Kollagen III und Kollagen IV kommen in geringen Mengen vor.

- nichtkollagene, extrazelluläre Matrixproteine: die Glykoproteine (z.B. Osteonectin, BAG-75), die Proteoglykane (z.B. Biglycan, Decorin), die Gla-Proteine (z.B. Osteocalcin, Matrix-Gla-Protein) und die RGD-Proteine (z.B. Osteopontin=BSP I, BSP II, Fibronectin (Bätge et al., 1993).

An dieser Stelle möchte ich einige Proteine besonders hervorheben, die im Rahmen der Zellcharakterisierung mittels immunzytochemischer Experimente untersucht worden sind.

- Bone Sialoprotein = BSP I = Osteopontin: wird von Osteoblasten in Zellkultur synthetisiert (Prince C.W. & Butler W.T., 1987). Durch 1,25 Dihydroxycholecalciferol wird die Produktion dieses Proteins stimuliert. Es zeichnet sich durch eine Aminosäuresequenz (Arg-Gly-Asp) aus, die für einige Proteine der Zellmembran charakteristisch ist (Oldberg A. et al., 1986). Bei *in vitro* Experimenten unterstützte Osteopontin die Adhäsion von Osteoblasten an Plastikoberflächen, was auf eine verbindungsfördernde Wirkung des Osteopontin zwischen Osteoblasten und extrazellulärer Matrix schließen ließ (Somerman M.J. et al., 1987).
- Bone Sialoprotein = BSP II = Decorin oder Biglycan: wird sowohl von Osteoblasten als auch von Osteosarkomazellen sezerniert (Oldberg A. et al., 1986). Es zeichnet sich wie BSP I durch die Basis-AS-Sequenz (Arg-Gly-Asp) aus. Seine Funktion kann einerseits mit der Adhäsionsfähigkeit und andererseits mit chemotaktischen Wirkungen erklärt werden, da es auch in Resorptionsbereichen von Osteoklasten angetroffen wird.
- Alkalische Phosphatase: der reife Osteoblast zeichnet sich durch eine Vielzahl von enzymatischen und metabolischen Aktivitäten aus. Osteoblasten enthalten viel alkalische Phosphatase. Es handelt sich um ein typisches Osteoblastenenzym, weswegen es auch als histochemischer Marker für Osteoblasten benutzt wird (Wlodarski K.H., 1990).

- Typ I Kollagen: ist das Hauptmatrixprotein des Knochens. Es besteht aus drei Eiweißketten mit linksläufiger Helixstruktur, die zu einer rechtsdrehenden Tripelhelix verdrillt sind. Kollagen ist ein unlösliches Faserprotein, das aus einer großen Anzahl von Untereinheiten besteht, die durch kovalente Quervernetzung miteinander verbunden sind.

Kollagen wird wegen seiner Größe und der Unlöslichkeit bei physiologischen pH intrazellulär in Form einer makromolekularen löslichen Vorstufe bereitgestellt. Erst nach der Ausschleusung aus der Zelle wird das Kollagen in einem Reifungsprozeß zur unlöslichen Kollagenfaser. Am Kollagen finden sich Bereiche, die für die Adhäsion von Proteinen wie Laminin und Osteonectin zur Verfügung stehen. Etwa 94% des Kollagens bestehen aus Typ I. Kollagen vom Typ III und Typ IV machen den Rest aus. Kollagen vom Typ II konnte in Knochensubstanz nicht nachgewiesen werden (Whitson S.W. et al., 1984).

- Osteokalzin: ist ein niedermolekulares saures Protein (durch γ -Carboxyl-Glutaminsäurereste). Es wird von Osteoblasten synthetisiert und besitzt die Fähigkeit zur relativ selektiven Bindung von Ca^{2+} und unlöslichen Kalziumsalzen. Vermutlich ist es an der Auslösung und Regulation des Mineralisationsprozesses direkt beteiligt (Lian J.B. et al., 1985).

1.1.1 Die unterschiedlichen Zellen des Knochens

Das Knochengewebe unterliegt in Laufe des Lebens ständigen Umbauprozessen. Die den Knochen modellierenden Kräfte sind genau aufeinander abgestimmt, um den Grundbedürfnissen des Knochengewebes unter den Bedingungen von Entwicklung, Wachstum, Substanzerhaltung, Reparation und Altern zu genügen (Burkhardt R., 1992). Diese Umbauprozesse werden von verschiedenartigen Zellen durchgeführt, welche durch Proliferation und anschließende Differenzierung aus Vorläuferzellen entstanden sind. Zell-Differenzierung kann in zwei Phasen unterteilt werden, einer morphogenetischen Phase und einer Zytodifferenzierungsphase.

Die morphogenetische Phase besteht aus Zell-Disaggregation, Wanderung, Reaggregation und Proliferation. Die Zytodifferenzierungsphase führt zu einem reifen funktionierenden spezialisierten Gewebe. Der Differenzierungsprozess ist durch Kombination des endokrinen Systems und lokal wirkender Faktoren kontrolliert. Die dafür benötigten Zellen stammen sowohl vom Periost, Endost als auch vom Knochenmark ab.

Mit Hilfe der Zellkulturtechnik konnte erstmals die Existenz von *Osteoblasten-Vorläuferzellen* gezeigt werden. Osteoblasten können sich aus einer pluripotenten fibroblastoiden Stammzelle mit myogenem, adipogenem und chondrogenem Potential entwickeln (Mayer, Scutt et al., 1992). Es existieren wohl wenigstens zwei Typen von Osteoblastenvorläuferzellen. Zum einen solche, die spontan direkt in Osteoblasten differenzieren können, sich im Knochenmark, Endost und Periost befinden und zum anderen solche, die induziert

werden müssen, um Osteoblasten zu bilden (Grigoriadis, A.E., Heersche et al., 1990). Sie sind vor allem in extraskelletalen Bereichen verbreitet und differenzieren bei adäquatem Reiz (Krzysztof H., Wlodarski M.D., 1990). Der Osteoblast ist die eigentliche knochenbildende Zelle. Wenn die Knochenbildung beendet ist, können sich Osteoblasten sowohl in Osteoprogenitorzellen oder auch in Osteozyten transformieren.

Osteozyten stellen den häufigsten Zelltyp im reifen Knochen dar (Aarden, E.M. et al., 1994). Osteozyten differenzieren sich aus Osteoblasten, nachdem diese von der neu gebildeten Interzellulärsubstanz umgeben wurden. Es kommt zu einer allmählichen Größenabnahme und der reife Osteozyt besitzt nur noch 30% des Zellvolumens eines Osteoblasten. Die Osteozyten kommunizieren über lange Zellfortsätze miteinander. Ihnen bleibt eine Reststoffwechselaktivität erhalten, da die Osteozyten eine wichtige Rolle für die Kalziumhomöostase spielen.

Sie können Interzellulärsubstanz auflösen und die frei werdenden Knochenmineralien resorbieren. Osteozyten stehen mit den Osteoblasten über gap junctions in Verbindung und bilden ein funktionelles Synzythium (Burkhardt R. 1992). Das Knochengewebe ist trotz seiner physikalischen Starrheit ein von Parenchymzellen getragenes, lebendes Gewebe, die Vorgänge des Stoffwechsels werden insbesondere durch die Osteoblasten und Osteoklasten ausgeführt.

Die *Osteoklasten* entstehen durch Fusion von mononukleären Vorläufern, die extraskelletalen Ursprungs sind. Die Osteoklasten leiten sich nicht von Makrophagen ab, da sie sich durch bestimmte Eigenschaften wie z.B. das Besitzen von „ruffled borders“ Kalzitoninrezeptoren und Kalzitoninwirkung unterscheiden. Zu den Charakteristika dieser Osteoklasten im histochemischen Sinne gehört

der Nachweis tartratresistenter saurer Phosphatase, sowie der fehlende Nachweis von unspezifischen Esterasen (H.v. Lilienfeld-Toal, 1992). Durch die aktive Sekretion einer organischen Säure (saure Phosphatase) wird in der direkten Umgebung ein niedriger pH-Wert hervorgerufen und es kommt zum Anlösen der Hydroxylapatitkristalle.

Durch die beginnende Knochenresorption der Osteoklasten werden unmittelbar auch Osteoblasten aktiviert. Diese Aktivierung kann durch lokale Faktoren, wie Prostaglandine oder Lymphokine kontrolliert werden und wird zusätzlich durch einige systemische Hormone, wie Schilddrüsenhormone, Parathormon, 1,25-dihydroxycholecalciferol, Kalzitinin, Sexualhormone und Wachstumshormone gesteuert (Melsen F., Steiniche T., 1992).

Spekulativ ist, daß Osteoklasten erst dann den Knochen erreichen und ihn resorbieren können, wenn lining cells, die die Oberfläche bedecken, sich zusammenziehen und dadurch die Oberfläche freigeben. Ein möglicher anderer Mechanismus ist der Effekt, daß die aktivierten Osteoblasten, die die Oberfläche des Knochens besetzt halten, Faktoren freisetzen, welche die Aktivität und Zahl der Osteoklasten bestimmen (H.v. Lilienfeld-Toal, 1992).

1.1.2 Morphologie und biochemische Charakteristika des Osteoblasten im Speziellen

Die Precursorzelle des Osteoblasten leitet sich von einer multipotenten Stammzelle des Mesenchyms ab (Rodan, G.A., et al., 1991). Aus der Stromazelle entwickelt sich ein Präosteoblast, der sich vermehrend an einer prädisponierten von Osteoklasten vorbearbeiteten Endostoberfläche des Knochens in Form eines dicht verzahnten epithelartigen Belages ansiedelt, in die typische Gestalt des reifen Osteoblasten transformiert wird und dann mit der Knochenneubildung beginnt (Abendroth K., 1992).

Der mineralisierte, neugebildete Knochen ist das Resultat der Leistung der Osteoblasten. Es gibt drei verschiedene Mechanismen der Osteoblasten, die mineralisierte Matrix des Knochens zu formieren. Zuerst wird die Grundsubstanz, das Kollagen Typ I gebildet, mit der er die Grundlage für den Aufbau neuer Knochensubstanz schafft. Nun werden geeignete Mineralkomponenten zur Kristallentwicklung benötigt. Hierfür synthetisiert der Osteoblast die nichtkollagenen Makromoleküle Osteokalzin und vor allem Osteonectin; durch sie kommt es zum Kristalleinbau und zur Kristallfixierung in der Kollagenmatrix. Desweiteren kann der Osteoblast die Kristallgröße regulieren und ebenso das Gewebewachstum.

Zur Verhinderung der die Lebensvorgänge störenden, spontanen anorganischen Kristallbildung bzw. kristallinen Ausfällungen hat der Organismus Pyrophosphatverbindungen entwickelt, die es nun im Wirkungsbereich der Osteoblasten zu eliminieren, zu inhibieren gilt. Der Osteoblast verfügt dazu über eine Reihe von Phosphatasen und

Phosphohydrolasen. Hier ist das Hauptwirkungsfeld auch der alkalischen Knochenphosphatase zu sehen (Abendroth K., 1992). Nun gibt es bestimmte Faktoren, die den Entwicklungsweg von Mesenchymzellen über Proliferation bis hin zu postmitotischen und schließlich differenzierten Osteoblasten beeinflussen. Wachstumsfaktoren und Zytokine spielen hier eine entscheidende Rolle (Siddhanti S.R., Quarles L.D., 1994).

Wachstumsfaktoren sind Peptide / Polypeptide, die lokal aktiviert werden und unterschiedliche Wirkungen haben können. Zu ihnen gehören: IGF1 (Insulin-like growth factor), EGF (Epidermis growth factor), TGF α (Transforming growth factor alpha), TGF β (Transforming growth factor beta), PDGF (Platelet-derived growth factor), BMP (Bone morphogenetic protein) und BMP-1 (Bone morphogenetic protein – 1).

IGF1 wird wahrscheinlich als Folge der Wirkung des Wachstumshormons im Knochen selbst gebildet und stimuliert hier die DNA – Synthese in den Osteoblasten. Für TGF α und EGF gibt es Rezeptoren auf den Osteoblasten und EGF ist ebenfalls in der Lage, die DNA – Synthese in den Blasten zu stimulieren.

PDGF ist die Hauptkomponente der Thrombozyten und wird von diesen bei der Gerinnung freigesetzt. PDGF stimuliert die DNA und über diese die Proteinsynthese der Osteoblasten und hat somit einen entscheidenden Einfluß bei der Frakturheilung. BMP ist ein aus Knochenmaterial hergestelltes, osteoinduktives Proteingemisch und gehört zu der TGF β – Superfamilie (Urist et al., 1979). BMP-1 gehört nicht zu der TGF β – Familie, sondern es ist eine Prokollagen C-Protease und spielt eine essentielle Rolle in der Morphogenese (Kessler et al., 1996).

Im Zentrum des Interesses bezüglich der Osteoblasten steht bei diesen Faktoren heute TGF β . Er wird als inaktive Form von den Osteoblasten gebildet und lokal gebunden, auch in der sich bildenden neuen Knochenmatrix.

TGF β wird als Promotor vieler Gene angesehen, die für die Peptidbildung und die Rezeptorausprägung verantwortlich sind. Da Osteoblasten selbst TGF β produzieren und für TGF β auch selbst Rezeptoren entwickeln, ist eine autokrine Regulation bei extrazellulärer TGF β – Aktivierung möglich. Die Aktivierung von TGF β ist durch einen sauren pH oder durch Proteasen wie Plasmin oder Kathepsin möglich. Somit wird der von der Zelle sezernierte inaktive TGF β Komplex durch proteolytische Spaltung aktiviert (Lin et al., 1993). Die Proteasen werden stets lokal in ihren Vorstufen bereitgehalten und als Gegenregulatoren dienen gleichzeitig produzierte Inhibitoren. Der Osteoblast ist in diesem System der Produzent des Plasminaktivator-Inhibitors und sichert auf diese Weise nach Stimulation von außen z.B. durch PTH die Rückkehr in die Ausgangslage (Abendroth K., 1992).

Zytokine sind lösliche Botenstoffe im Sinne von Lokalhormonen, sie werden von hämatopoetischen Zellen freigesetzt und haben teilweise eine erhebliche Auswirkung auf den Knochen (Lilienfeld-Toal H.v., 1992). Zu nennen sind hier:

- *Interleukin-1*, diese Substanz stimuliert die Knochenresorption, sie stellt wahrscheinlich den wesentlichen Anteil des OAF (Osteoklastenaktivierender Faktor) dar. Zusätzlich hat sie eine steigernde Wirkung auf die Osteoblastenreplikation und auf die Kollagensynthese der Osteoblasten.
- *Interferon-gamma*, inhibiert die Proliferation von Osteoblasten, unterdrückt die Knochenresorption und vermindert die Kollagensynthese.

- *TNF alpha/beta (Tumor necrosis factor)*, sind Produkte von aktivierten Makrophagen. $\text{TNF}\beta$ (Lymphotoxin) veranlaßt die Osteoblasten zu einer Vermehrung, allerdings unterdrückt er die Kollagensynthese.

Ihnen allen wird eine bedeutende Rolle im Knochenstoffwechsel zugesprochen (Burkhardt R., 1992).

Die an der Regulation des Knochenstoffwechsels zahlreich beteiligten Hormone und Wachstumsfaktoren werden entweder durch Knochenzellen selbst, durch hämatopoetische Zellen, durch Endothelzellen oder durch Fibroblasten synthetisiert (Canalis et al., 1988).

Eine Reihe dieser Faktoren wird von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1,25-Dihydroxycholecalciferol) beeinflusst. Zusammen mit dem Parathormon (PTH) ist der biologisch aktive Vitamin D Metabolit ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) der wichtigste hormonelle Regulator des Kalziumstoffwechsels. Die Wirkungsweise entspricht der eines klassischen Steroidhormones. Die Effekte auf die Zielzelle werden über Bindung des Hormons an Rezeptorproteine vermittelt, wobei sich der Hormon-Rezeptor-Komplex im Zellkern an spezifische DNA Sequenzen eines Ziel-Gens bindet und damit die Transkription des Gens und nachfolgend die Proteinsynthese der Zelle verändert.

Die direkte Zielzelle von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Knochen ist der Osteoblast, bei dem der Vitamin D-Rezeptor nachgewiesen wurde (Chen, Cohn et al., 1983). Es kommt zu einer gesteigerten Synthese von Osteokalzin, Fibronectin, EGF-Rezeptor und $\text{TGF } \beta$ in den Osteoblasten (Reichel H., 1992). Im Gegensatz dazu weist der Osteoklast keinen Vitamin D-Rezeptor auf (Merke J., et al., 1986), und ist somit keine direkte Zielzelle für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Das bereits erwähnte Parathormon wirkt auf den Kalzium-und Phosphat-Metabolismus des Knochens und steigert den Blutkalziumspiegel. Im allgemeinen verursacht es bei Ausschüttung aus der Nebenschilddrüse eine Hemmung der Osteoblasten und eine Stimulation der Osteoklasten.

Die Wirkung von PTH wird über die Phospholipase C und die Adenylatzyklase vermittelt (Fujimori et al., 1992). PTH bewirkt so eine erhöhte DNA-Synthese (van der Plas et al., 1985), Zellproliferation (Whitefield et al., 1979) und, unter Zugabe von Vitamin D, eine Knochenapposition (Slovik et al., 1986). Es kommt somit zu einer Kalziummobilisierung aus der Skelettmasse.

Es resultiert eine vielschichtige und ineinander verzahnte Wirkungsweise von PTH und D-Hormon. Da PTH die Vermehrung der Osteoblasten stimuliert, kommt es durch das D-Hormon zu einer gegenregulierenden Wirkung. Der Osteoblast weist für alle bekannten auch osteoklastisch wirksamen Substanzen Rezeptoren auf, was auch für Hormone gilt, denen man antiosteoklastäre Wirkungen zuschreibt. Zu den systemischen Hormonen zählen noch, neben den oben genannten: Vitamin A, Östrogene, Progesterone, Androgene, Glukokortikoide und Schilddrüsenhormone (Abendroth, 1992).

1.2 Die Mechanotransduktion und die Prinzipien der Dehnung

Unter Signaltransduktion versteht man einen Vorgang, bei dem ein extrazellulärer Stimulus eine physiologische Antwort hervorruft. Kommt dieser Stimulus durch einen mechanischen Reiz zustande, so spricht man von Mechanotransduktion. Daß mechanische Stimulation einen entscheidenden Einfluß auf knöcherne Umbauvorgänge nimmt, ist schon seit über einem Jahrhundert bekannt. Der Berliner Chirurg Julius Wolff (Wolff et al., 1869) glaubte seinerzeit an eine erbliche Vorbestimmung des Knochenbaus. Der Knochen sollte im Laufe des Lebens durch genetische Disposition und durch mechanische Belastung verändert werden. Eine Knochenresorption hielt er für nicht möglich.

Diese Theorie ist gewissermaßen anerkannt, jedoch ist sie in der ursprünglichen Auffassung nicht gültig. Heute geht man davon aus, daß der Knochen der mechanischen Belastung durch das Knochen „remodeling“ angepaßt wird. Der Begriff wurde durch Wilhelm Roux geprägt, in seinem Buch „Kampf der Teile im Organismus“, wo er das Anpassungsvermögen des Knochens an mechanische Gegebenheiten postulierte.

Um eine Größenvorstellung der biomechanischen Kräfte die auf den Knochen wirken zu bekommen, führte Lanyon L.E. et al., 1984 Belastungen mit definierten Kräften im physiologischen Bereich durch. Er fand heraus, daß es bei einer Belastung von weniger als $500\mu\text{str}$ zu einer Atrophie der knöchernen Substanz kam, im Bereich von $500\mu\text{str}$.- $1500\mu\text{str}$. wurde der status quo gehalten und bei Belastungen von über $1500\mu\text{str}$. war eine Zunahme der Knochensubstanz zu beobachten.

Heute geht man von einem physiologischen Bereich von 3000µstr. aus. Werte von über 5000µstr. sind bereits unphysiologisch, da der Knochen sich in diesem Bereich nicht mehr elastisch verhält und es zu Mikrofrakturen kommt (Jones, D.B., 1991).

Die Belastung durch Dehnung ist definiert als Längenänderung pro Längeneinheit. Folglich ist die Dehnung als solche dimensionlos. Dehnung wird im englischen Sprachgebrauch mit „strain“ bezeichnet und 1 strain ist definiert als Längenänderung von 100%. Zur Durchführung der Dehnung ist die in unserem Labor entwickelte „four point bending“ Maschine benutzt worden. Die Größe der entstehenden Deformation hängt von verschiedenen Parametern ab, wie der Dicke des verwendeten Materials (h), dem Abstand der Widerlager (D) und der Durchbiegung (y). Für die Berechnung der Dehnung nach (Jones D.B. et al., 1993) gilt von daher:

$$S = \frac{4hy}{D^2 + 4y^2}$$

Mit Hilfe dieser Formel kann die Spannung ermittelt werden, ohne ein Spannungsmeßinstrument zu benutzen, da die verwendete Polycarbonatplatte im Sinne einer gleichmäßigen Kurve gebogen wird und somit ein geometrisches Modell verwendet werden kann, um die Spannung sowohl auf der Zugseite als auch auf der Dehnungsseite zu beschreiben. So ist bei gegebener Dicke einer Platte die an der Oberfläche entstehende Spannung direkt abhängig von der zu berechnenden Auslenkung. Aufgrund dieser Tatsache kann die „four point bending“ Maschine benutzt werden, um definierte Spannungen zu erzielen. Da sich die zu dehnenden Zellen in Flüssigkeit befinden, ist auch das Strömungsverhalten dieser Flüssigkeit auf diese Weise zu beeinflussen (Jones D.B. et al., 1993).

Osteoblasten reagieren vielfältig auf mechanische Stimulation. Wenn die mechanische Belastung auf ein Gewebe zunimmt, können diese Zellen ihre Leistung und oftmals ihre Größe durch eine erhöhte Zellteilungsrate steigern. Eine Reduktion der Belastung mindert die Leistung der Zellen und die katabolische Aktivität nimmt zu und es kommt zu einer Degeneration des Gewebes.

Der Prozess von anabolischen und katabolischen Vorgängen im Gewebe wird durch mechanische Belastung reguliert im Zusammenhang mit lokalen und systemischen Hormonen, um sicherzustellen, daß das Gewebe auf die Forderung der mechanischen Umgebung eingehen kann. Auf der anderen Seite kann eine zu hohe Belastung ein Gewebs-Matrixversagen verursachen und somit Zellen beschädigen, was sich in einer Entzündung äußern kann (Jones D.B. et al., 1995). Die mechanische Umgebung könnte externem Streß zuzuschreiben sein, z.B. Schwerkraft, Wind, Vibrationen und Bewegungen.

Selbst verursachter (interner) Streß kann durch die Kontraktion des Zytoskeletts zustande kommen, wodurch Bewegung, Zellspannung und Zellteilung verursacht werden und auch aufgrund von Muskelaktionen in anderen Geweben (Jones D.B., Leivseth G. et al., 1995).

Die Dehnung transduzierenden Mechanismen der Knochenzellen gehören zu den empfindlichsten, fast gleichzustellen mit spezialisierten Organen wie dem Gehörapparat. Es gibt verschiedene Theorien über die Wahrnehmung von mechanischer Stimulation durch den Osteoblasten. Zum einen nimmt man an, daß die zu Deformierungen führende mechanische Belastung einen Flüssigkeitsfluß im Interzellularraum nach sich zieht und so Flüssigkeitsscherkräfte wirksam werden.

Man vermutet, daß durch den Flüssigkeitsfluß Ladungen auf die Zellmembran übertragen werden, die elektrische Potentiale erzeugen können (Turner et al., 1994). Kontrovers diskutiert wird diese Meinung durch Reich et al., 1990, er vermutet durch Flüssigkeitsscherkräfte eine direkte second messenger - Aktivierung ohne Auslösung von elektrischen Potentialen.

Zum anderen geht man von mechano-sensitiven Ionenkanälen aus (Duncan et al., 1994; Davidson et al., 1990), d.h. durch die Belastung werden bestimmte Ionenkanäle geöffnet und somit durch die Konzentrationsänderung spezieller Ionen die Signaltransduktion in Gang gesetzt. Es wurde herausgefunden, daß sich zuerst primäre Kalium-Kanäle und dann Kalzium-Kanäle öffnen (Jones D.B. und Bingmann, 1991). Unklar an dieser Theorie ist der genaue Mechanismus zur Öffnung der Kanäle.

Es ist bekannt, daß Osteozyten ein primäres Zilium ausbilden und Knorpelzellen sogar ein gut entwickeltes Zilium besitzen (Federman und Nichols, 1974). Es ist nicht erwiesen, ob Osteoblasten ein primäres Zilium haben, und wenn, ob sie damit die mechanische Belastung wahrnehmen können. Aus Zentriolen hervorgehende Mikrotubuli werden als primäres Zilium bezeichnet. Sie sind aus Tubulinmolekülen aufgebaut und können Bewegungen wahrnehmen oder erzeugen. Oft ist ein Zilium nur rudimentär entwickelt, allerdings reicht schon eine Länge von 500nm, um Bewegung wahrzunehmen (Satir et al., 1990; Jones D.B. et al., 1995).

Andere Autoren gehen von einem Zusammenspiel von extrazellulärer Matrix, transmembranen Rezeptoren und dem Zytoskelett aus (Burridge et al., 1988). Man nimmt an, daß durch die mechanische Belastung die extrazelluläre Matrix bewegt wird. Diese ist durch transmembrane Rezeptoren, die Integrine, mit dem Zytoskelett verbunden, welches dann diese Information weiterleiten kann.

Das Zytoskelett als dynamische Struktur besteht aus drei Haupttypen von Proteinfilamenten: Aktin, Tubulin und Intermediärfilamente. Wenn Dehnung auf eine Zelle wirksam wird, wird dies auf das Zytoskelett übertragen und wirkt auf Mechanotransduktoren, wie möglicherweise Ionenkanäle oder Na-H⁺-Pumpen (Watson et al., 1991).

Die Resultate von mechanischer Stimulation sind Proliferation und Wachstum der Zelle. Allerdings müssen für diese Vorgänge die Zellen verankert sein, d.h. es muß erst eine Anheftung der Zellen an eine Unterlage stattfinden.

1.3 Signalweiterleitung zum Kern über die Adenylat-Zyklase-Kaskade und die Inositidphosphat-Kaskade mit Beschreibung der Phospholipase C im Besonderen

Es ist bekannt, daß humorale Signale die Zielzelle auf extrazellulärem Wege über an der Außenseite der Zielzellenmembran sich befindende Hormonrezeptoren erreichen und eine Freisetzung von second messengern im Zellinneren bewirkt wird.

Für eine cAMP-vermittelte Zellantwort muß die Membran der Zielzelle neben dem Rezeptor, auch stimulierende und/oder inhibitorische Guanylnukleotid-regulatorische Proteine, G_s und G_i enthalten. Sie bestehen aus drei Untereinheiten α_s bzw. α_i , β und γ . In Ruhe ist an die α - Untereinheit das Guanosindiphosphat (GDP) gebunden. Der stimulierende Hormon-Rezeptorkomplex bindet sich an G_s GDP, dieses wird nun durch zytosolisches GTP ersetzt und gleichzeitig werden die β, γ - Untereinheiten und der Hormonrezeptorkomplex abgespalten, wozu Mg^{2+} notwendig ist.

Übrig bleibt α_s - GTP, das die Adenylatzyklase an der Membraninnenseite aktiviert, wodurch es zu einem Anstieg von cAMP kommt. cAMP aktiviert Proteinkinasen, mit deren Hilfe Proteine phosphoryliert werden, siehe **Abb. 1**. Die spezifische Zellantwort hängt von der Art des phosphorylierten Proteins ab, das wiederum durch die jeweilige in der Zielzelle vorhandene Proteinkinase bestimmt wird (Silbernagel et al., 1991).

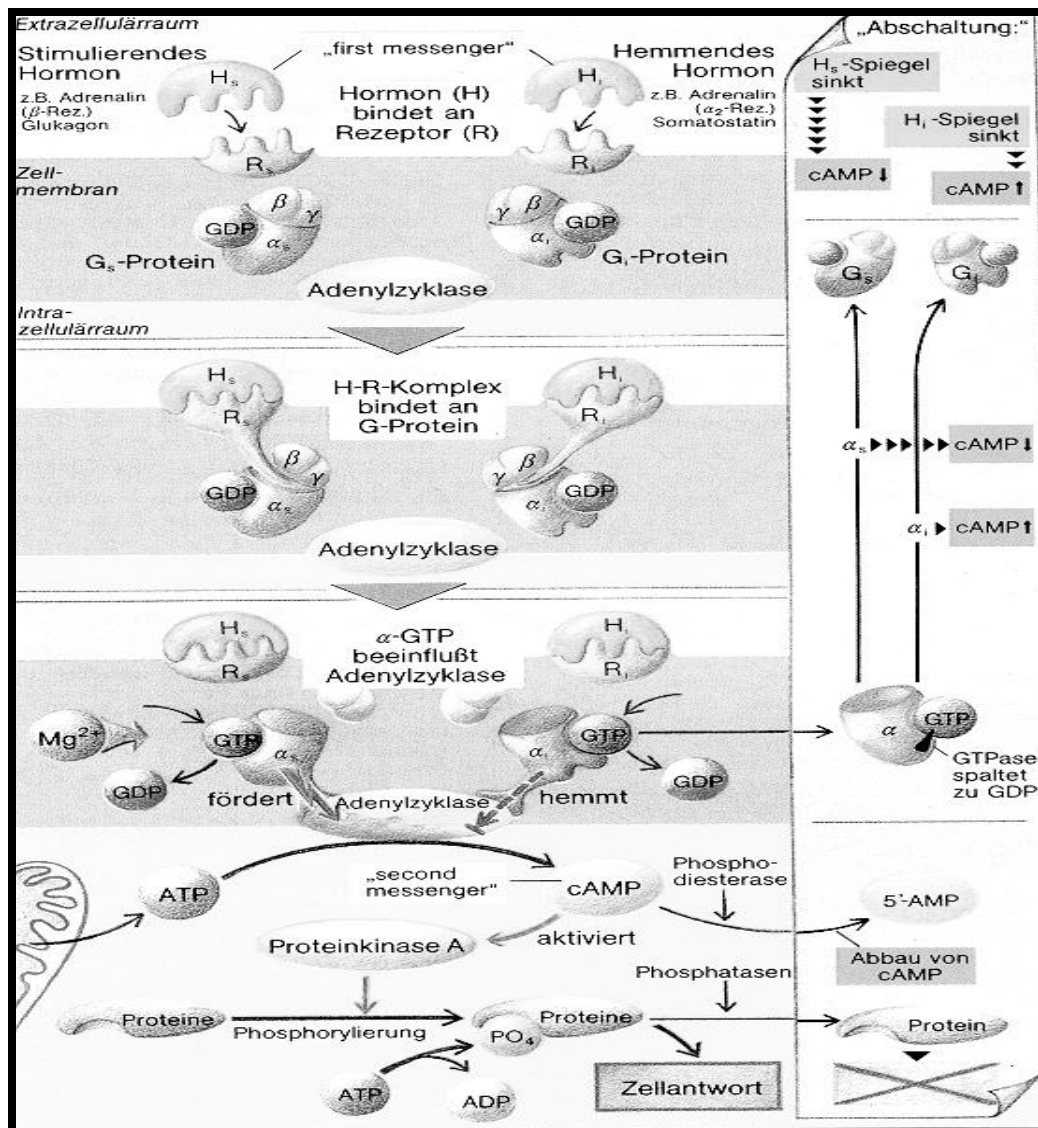


Abb. 1: Übersicht der Adenylat-Zyklase-Kaskade aus Silbernagel et al., Physiologie-Atlas. Durch die Stimulierung einer Zelle mit einem Hormon-Rezeptorkomplex wird die Adenylatzyklase aktiviert und es kommt zur Freisetzung der second-messenger.

Es stellt sich nun die Frage, inwieweit diese Kaskade bei mechanischer Stimulation in Gang gesetzt wird. Bei mechanischer Stimulation von Knochenzellen konnte gezeigt werden, daß die Adenylat-Zyklase-Kaskade in die Signaltransduktion involviert ist, indem ein Konzentrationsanstieg von cAMP festgestellt wurde (Davidovitch et al., 1984).

Da dieser Anstieg zeitlich verzögert auftritt, scheint eine Aktivierung der Adenylat-Zyklase-Kaskade als primäre Antwort unwahrscheinlich. Es wurde an anderen Zellen (S49-Maus-Lymphomzellen) gezeigt, daß sich der Adenylatzyklaseanstieg (und somit der cAMP-Anstieg) nicht durch Inhibition der G-Proteine verhindern läßt (Watson et al., 1991). Somit scheint der Anstieg von cAMP auf Dehnung auch unabhängig von den G-Proteinen zu erfolgen. Man kann schlußfolgern, daß die Adenylat-Zyklase-Kaskade eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielt, allerdings ist sie nicht der ausschließliche Weg.

Jones D.B. et al., 1991 haben herausgefunden, daß eine erste erkennbare Reaktion der Zelle nach physiologischer Dehnung in einer erhöhten intrazellulären, nach 80 ms nachweisbaren Ca^{2+} -Konzentration besteht. Kalziumionen sind an der Regulierung von Zellproliferation und Differenzierung beteiligt. Jones D.B. et al., 1987 waren die Ersten, die eine durch mechanische Stimulation aktivierte Phosphatidyl-Inositol spezifische Phospholipase C (PI-PLC) in direkten Zusammenhang mit der erhöhten Ca^{2+} -Konzentration nach Dehnung brachten.

Wenn PI-PLC aktiviert wird, kommt es zur Transformierung des Substrates Phosphatidyl - Inositol - 4,5 Bisphosphat (PIP_2). Daraus entstehen dann Inositol – 1,4,5 Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). IP_3 führt zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und DAG aktiviert das Enzym Proteinkinase C (PKC) und führt so zu verschiedenen Zellantworten (Berridge and Irvine, 1984; Majerus, 1992; Nishizuka, 1984). Der hydrolytische Schritt von PIP_2 zu den second messengern IP_3 und DAG wird katalysiert durch Phospholipase C (PLC) (Ningshu et al., 1996). In **Abb. 2** sind diese Zusammenhänge in der Übersicht dargestellt.

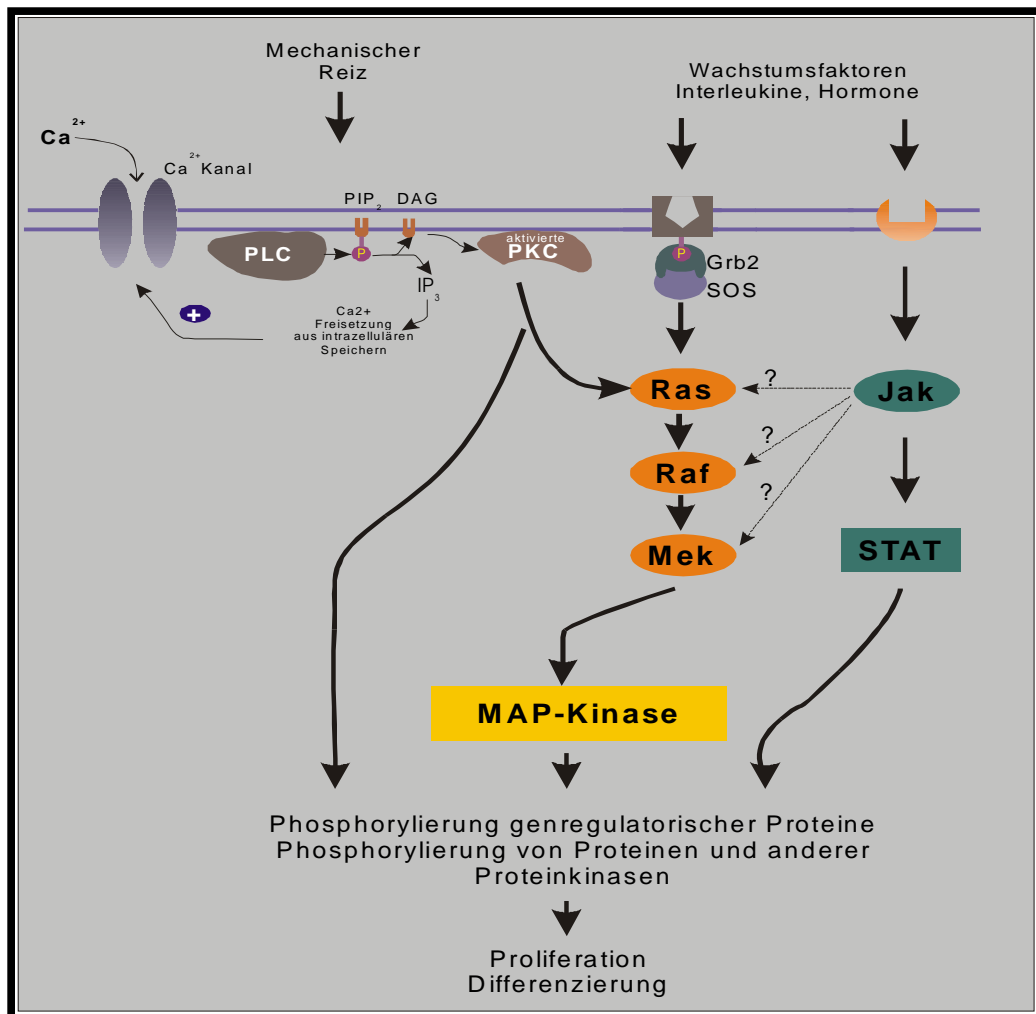


Abb. 2: Darstellung des hydrolytischen Schrittes von PIP_2 zu den „Second-Messengern“ IP_3 und DAG, katalysiert durch PLC und der Weg zur Phosphorylierung eines Proteins.

Zur Differenzierung sind die PLC's in drei Hauptgruppen unterteilt, die auf der Basis von spezifischen für jede Gruppe typischen Strukturen beruhen (Rhee et al., 1989; Kritz et al., 1991; Lee et al., 1993; Jhon et al., 1993). Die Gruppe der β - Isoformen gliedert sich in $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ und $\beta 4$, die γ - Isoformen gliedern sich in $\gamma 1$ und $\gamma 2$ und die δ - Isoformen in $\delta 1$, $\delta 2$ und $\delta 4$. Die Existenz der vielen verschiedenen Formen der PLC's läßt vermuten, daß sich die Isoenzyme in der Verteilung im Gewebe, in der intrazellulären Verteilung, im Regulationsmechanismus und auch in den Funktionen der Informationsweiterleitung unterscheiden.

Tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, daß jede PLC ein eigenes Verteilungsmuster besitzt und daß sie an verschiedene Signalsysteme binden. Der β - Typ der Isoenzyme wird aktiviert über G – Proteine (Taylon et al., 1991; Smrcka et al., 1991; Camp et al., 1992; Kratz et al., 1992). Der γ - Typ hingegen wird aktiviert und reguliert über Tyrosinkinasen (Wahl et al., 1989; Meisenhelder et al., 1989; Margolis et al., 1989; Morrison et al., 1990; Kim et al., 1991). Die Regulationsmechanismen der δ - Isoenzyme sind noch weitgehend unbekannt.

Alle PLC's haben als Grundstruktur vier Domänen (Essen et al., 1996):

- Die *pleckstrin homology-Domäne (PH-Domäne)*. Die PH-Domäne ist elektrostatisch polarisiert und enthält eine Art Tasche, die evtl. für die Ligandenbindung (hier PIP_2) wichtig ist. Sie besteht aus einer antiparallelen β -Kette, die sich aus 7 Strängen zusammensetzt. Der dritte und vierte Strang haben einen langen Anheftungsbereich, der zwei SH2 und eine SH3 Domäne enthält. Ihre genaue Funktion ist noch unbekannt.
- Die *EF-Hand-Domäne*. Das N-terminale Ende der PLC enthält vier aufeinanderfolgende EF-Hand Motive. Sie sind ähnlich wie beim Calmodulin paarweise angeordnet, es gibt jedoch keinen Beweis für die regulatorische Kontrolle des Kalziums (Nakashima et al., 1995), was der entscheidende Unterschied zu Calmodulin ist.
- Die *katalytische Domäne*. Sie besteht aus einer X- und einer Y-Region. Die Verbindung zwischen den beiden Regionen ist ein Strang, der allerdings für die Enzymaktivität nicht von Bedeutung ist. Hier hat die PLC- γ ihre zusätzlichen PH-Domänen. Die aktive Seite der katalytischen Domäne ist an dem C-terminalen Ende lokalisiert.
- Die *C2-ähnliche Domäne*. Untersuchungen an Synaptotagmin I (Sutton et al., 1995) haben gezeigt, daß sich hier vier Aspartat-Reste befinden, die Kalzium binden können. Dies nennt man die Kalzium-vermittelte-Lipid-Bindungsstelle, sie ist auch für die C2-Domäne der PLC denkbar.

Die über G – Proteine aktivierte β - Form hat eine zusätzliche regulatorische C-terminale Region (**Abb. 3**), die für die Bindung und Aktivierung durch die G_{α} - Untereinheit verantwortlich ist (Taylor et al., 1991). Die γ - Formen haben eine zusätzliche PH-Domäne und weiterhin zwei SH2 und eine SH3 Domäne (**Abb. 3**). Eine interne SH2/SH3 Domäne liegt zwischen der X- und Y- Region und ist an der Regulation durch Tyrosinkinase-Rezeptoren beteiligt (Lee et al., 1995).

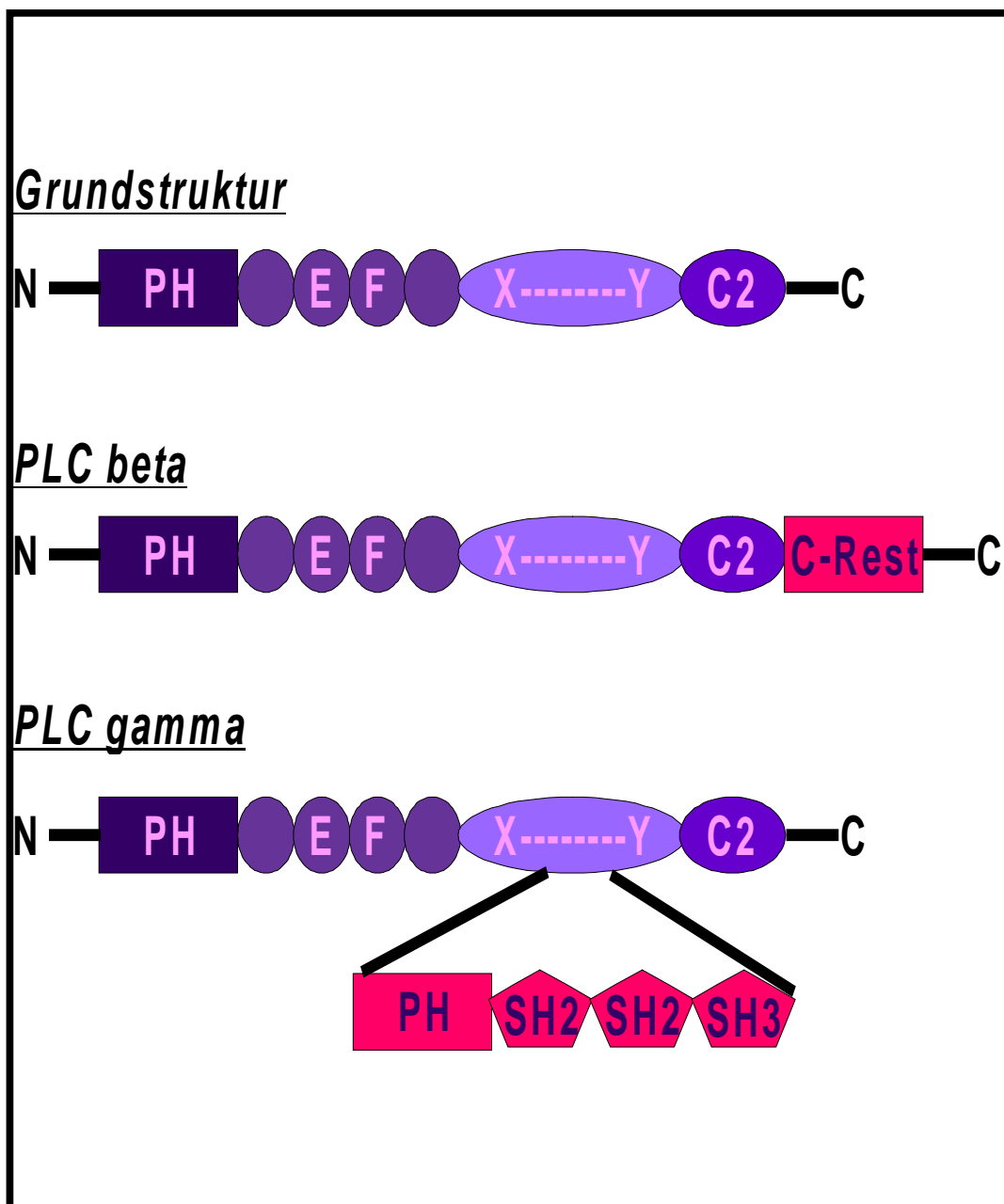


Abb. 3: Die Grundstruktur der PLC-Domänen im Vergleich zur beta und gamma Form, nach Vorlage von Irvine et al., 1996.

1.4 Transformierte Humane Osteoblasten (THO) und die Immortalisierung mit dem Simian Virus 40

Zur Gewinnung einer humanen Osteoblasten Zellkultur diente Kieferknochen eines Erwachsenen. Die daraus gewonnenen Zellen sind bis zur 4. Passage kultiviert worden, um dann mit dem Simian Virus 40 (SV40) immortalisiert zu werden. SV40 zählt zu der Gruppe der Polyomaviren. Diese wiederum gehören zusammen mit den Papillomaviren und den Vacuolating-Viren zur großen Gruppe der Papovaviren.

SV 40 bietet außerordentliche Vorteile für die Vektorentwicklung. Das virale Genom ist ein kleines, zirkuläres DNA-Molekül, dessen Basensequenz bekannt ist (Fiers et al., 1978; Reddy et al., 1978). Es ist vergleichsweise leicht isolierbar, und die verschiedenen viralen Funktionen sind auf dem 5243 Basenpaare langen DNA-Molekül exakt kartiert. SV40-DNA läßt sich aus Virus-Partikeln in einer doppelsträngigen, superhelikalen Form isolieren, die als Form-I-DNA bezeichnet wird.

Diese Superhelizität der Form-I-DNA ist Ausdruck einer besonderen Spannung in diesem DNA-Molekül und rührt daher, daß die SV40-DNA in der infizierten Zelle nicht nackt, sondern mit Histonen assoziiert vorliegt. Man spricht von einem sog. Mini-Chromosom, das aus insgesamt 24 Nukleosomen aufgebaut ist und die für Chromatin typische (perlenkettenartige) Struktur besitzt. Bei der Reinigung der DNA kommt es durch das Entfernen der Histone zur Zerstörung dieser Struktur und die nackte DNA reagiert auf den Verlust der nativen Struktur durch Ausbildung superhelikaler Windungen.

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen (Saragosti et al., 1980) und Verdauungen mit DNase I (Elgin, 1981; Varshavsky et al., 1979) konnte ermittelt werden, daß ein Bereich von ca. 400 Bp um den Ursprungspunkt der DNA-Replikation und den Start der „späten“ Transkription herum von Nukleosomen frei ist. Da die besondere Empfindlichkeit einer DNA-Region im Chromatin gegenüber DNase I als Hinweis dafür angesehen wird, daß diese Region aktiv transkribiert wird (Weisbrod S., 1982), muß auch der von Nukleosomen freien Region in der SV40-DNA eine besondere biologische Rolle beigemessen werden. Diese wird in der spezifischen Wechselwirkung mit dem T-Antigen gesehen.

Das große T-Antigen (90.000 Dalton) gehört wie das kleine t-Antigen (18.000 Dalton) zu den früh transkribierten Genen. Die Anwesenheit von T-Antigen ist Voraussetzung für eine produktive Infektion in permissiven Zellen. Während einer lytischen Infektion initiiert T-Antigen die virale DNA-Replikation, reguliert seine eigene Transkription (Rio et al., 1980) und aktiviert die späte Genexpression (Brady et al., 1984). Weiterhin stimuliert es die zelluläre DNA-Synthese.

T-Antigen besitzt die Fähigkeit, Tumore in Tieren zu erzeugen und Zellen in Kultur zu transformieren (Srinivasan et al., 1989). Diese Eigenschaften werden auf die Interaktion des T-Antigens mit zwei zellulären Proteinen, dem Retinoblastomgenprodukt und p53 zurückgeführt. Sie sind negative Regulatoren des Zellwachstums (Stanbridge et al., 1990), p53 wird als Tumorsuppressor der Zellen bezeichnet. Es handelt sich um einen „Sicherheitsposten“, der gebraucht wird, wenn die DNA einer Zelle beschädigt ist, um zu verhindern, daß die Zelle sich in eine Tumorzelle verwandelt (Dickman S., 1997).

Die SV40 Regulatorregion weist drei Bindungsstellen für T-Antigen auf, wobei Bindungsstelle I die höchste, III die niedrigste Affinität besitzt (Tavis J.E. et al., 1991). Während die Bindung von T-Antigen an die Bindungsstellen I und III die eigene Expression bzw. die der späteren Gene kontrolliert, spielt die Bindung an Stelle II innerhalb des „Core-origins“ eine zentrale Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation (Jones et al., 1984).

Im Gegensatz zum großen T-Antigen, von dem viele Funktionen in Bezug auf Regulation der zellulären und viralen Genexpression bekannt sind, weiß man erst relativ wenig über die Rolle des kleinen t-Antigens bei viraler Infektion. Das kleine t-Antigen spielt eine essentielle Rolle bei der Wechselwirkung mit nicht-permissiven Zellen und hat eine Helferfunktion beim Infektions- und Transformationsprozeß. Shenk et al., 1976, stellten fest, daß t-Antigen nur dann diese Funktionen ausübt, wenn T-Antigen in geringer Konzentration vorliegt. Wie Studien von Bikel & Loeken (1992) zeigen, hat das SV40 t-Antigen auch einen transaktivierenden Effekt auf den frühen und späten Promotor des SV40.

Es gilt das lytische von dem nicht-permissiven System zu unterscheiden. Die lytische Infektion führt immer zum Tod der infizierten Zellen, so daß sich nur Ereignisse untersuchen lassen, die innerhalb von ca. 48 Stunden zu beobachten sind. Dieser lytische Zyklus wird in nicht-permissiven Zellen, wie in den THO-Zellen vor Beginn der DNA-Replikation unterbrochen. Die frühe mRNA wird hier normal gebildet, die späten Funktionen können jedoch in Abwesenheit der DNA-Replikation nicht initiiert werden. Die Mehrzahl der infizierten Zellen überlebt diese Interaktion und wird zu transformierten Zellen. In solchen Zellen liegt die virale DNA in einer in die chromosomale DNA integrierten Form vor (Winnacker E.L., 1990).

1.5 Apoptosemechanismen

Der bei der Embryogenese, Metamorphose, der von Endokrinen abhängigen Gewebeatrophie und beim normalen Gewebewechsel vorkommende Zelltod ist ein programmierter, welcher mit dem Begriff Apoptose beschrieben wird (Nagata et al., 1997). Apoptose ist ein morphologisch bestimmter Ablauf des programmierten Zelltodes und spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Homeostase und bei vielen Krankheiten wie Krebserkrankungen, AIDS und neurodegenerativen Erkrankungen. Apoptose ereignet sich durch die Aktivierung eines der Zelle eigenen Suizidprogrammes. Die Basismaschinerie für die Ausführung der Apoptose scheint im wesentlichen in allen Säugetierzellen enthalten zu sein zu jeder Zeit, aber die Aktivierung des Suizidprogrammes ist über viele unterschiedliche Signale (**Abb. 4**) reguliert, welche sowohl von dem intrazellulären Milieu wie auch von dem extrazellulären Milieu ausgehen (Steller H., 1995).

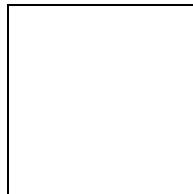


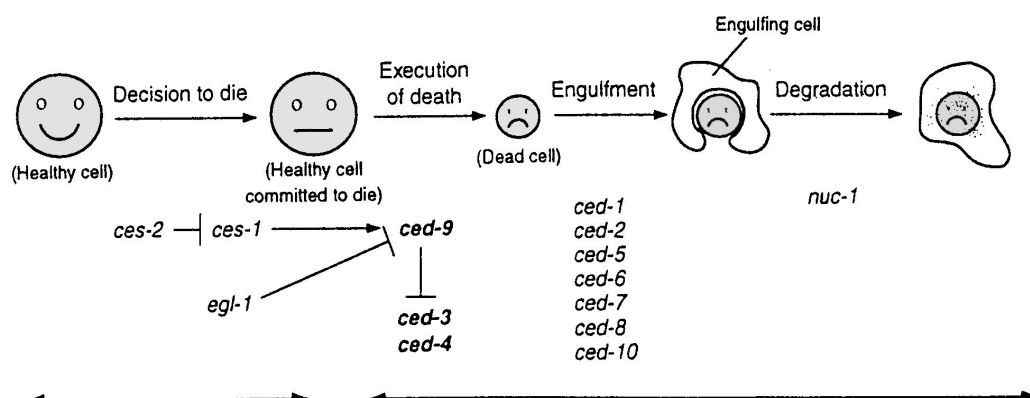
Abb. 4: Überblick über die Aktivierung der Apoptose durch die verschiedenen Caspasen, nach Dickinson B., 1999.

Die Vollziehung dieses Suizidprogrammes ist oft mit charakteristischen morphologischen und biochemischen Veränderungen verbunden und diese bestimmte Form des Zelltodes ist Apoptose genannt worden (M.C.Raff et al., 1992). Während des apoptotischen Prozesses verdichtet sich der Nukleus und das Zytoplasma und die sterbende Zelle zerfällt in Bruchstücke, welche dann als membran-gebundene apoptotische Körperchen schnell phagozytiert und von Makrophagen oder benachbarten Zellen verdaut werden. Auf diesem Wege werden tote Zellen schnell beseitigt und jeder Austritt von Schadstoffen und möglichen gefährlichen Inhalten wird vermieden.

Im Gegensatz dazu kommt es während der Nekrose, einer pathologischen Form des Zelltodes, welche hervorgerufen wird durch starke Zellschädigung, zu einer Zellschwellung und anschließender Lyse. Dadurch wird zytoplasmatisches Material freigesetzt, welches eine inflammatorische Antwort triggert. Apoptose ist gewöhnlich assoziiert mit einer Aktivierung von Nukleasen, welche die chromosomale DNA erst in große (50-300 kilobasen) und später in sehr kleine oligonukleosomale Fragmente spalten (M.C. Raff et al., 1993).

Die Apoptose ist eine bekannte Kraft in der Formung des sich entwickelnden Organismus (J.J.Cohen et al., 1992), ist desweiteren ein Hauptmechanismus für die genaue Regulierung der Zellanzahl (S. Nagata et al., 1994 ; B.C. Trauth et al., 1989) und ein Verteidigungsmechanismus, um ungewollte und potential gefährliche Zellen, wie selbstreaktive Lymphozyten (S. Yonehara et al., 1989), Zellen die von einem Virus infiziert sind (N. Itoh et. al., 1991; A. Oehm et al., 1992) und Tumorzellen (R. Watanabe-Fukunaga et al., 1992) zu entfernen. Somit überrascht es nicht, daß die Einleitung der Apoptose fein und vorsichtig reguliert ist. Viele verschiedene Signale, die entweder aus dem Inneren der Zelle oder von außerhalb stammen, beeinträchtigen die Entscheidung zwischen Leben und Tod.

Da es sich recht schwierig gestaltet, die für die Apoptose verantwortlichen Gene in Säugetierzellen zu bestimmen, kommt ein großteil unseres jetzigen Wissens, über spezifische Gene des Zelltodes, von genetischen Studien mit der Nematode *Caenorhabditis elegans* (Andjelic et al., 1995). Diese wirbellosen, leichter zugänglichen Systeme könnten direkt



übertragbar sein auf die Apoptosemechanismen in Wirbeltieren. Es konnten in der *C. elegans* verschiedene Mutationen gefunden werden, von denen 14 Gene abgrenzbar waren, die bei dem programmierten Zelltod eine Rolle spielen. Davon haben drei: *ced-3*, *ced-4* und *ced-9* eine große Relevanz für die Ausführung der Apoptose in allen somatischen Zellen (**Abb. 5**).

Abb. 5: *Drei Gene, die bei der Ausführung der Apoptose von Bedeutung sind. Ced-3 und ced-4 unterstützen den programmierten Zelltod, ced-9 verhindert diesen Prozess. Nach Steller et al., 1995.*

Die Gene *ced-3* und *ced-4* werden in zum Sterben verurteilten Zellen benötigt, damit diese in die Apoptosephase eintreten können. Das dritte Gen *ced-9* ist erforderlich, um Zellen zu beschützen, die überleben sollen (Debatin et al., 1994). Dieses Gen beinhaltet ein Protein, das auch in der den Zelltod regulierenden Bcl-2-Familie vorkommt (Falk et al., 1992; Möller et al., 1993).

Desweiteren kann die Expression von Bcl-2 den Zelltod in Nematoden inhibieren und sogar einen teilweisen Verlust von *ced-9* ausgleichen (Falk et al., 1992; Rouvier et al., 1993). Es gibt aus dieser Bcl-2-Familie, die die Apoptose verhindern kann, noch andere wichtige Mitglieder. Dies sind Bcl-X_L, Mcl-1 und A1. Jedoch gibt es auch Familienmitglieder, die im Gegensatz zu den vorher genannten die Apoptose fördern, zu ihnen zählen: Bad, Bak, Bax und Bcl-X_S.

Auf einem Wege wird die Apoptose durch bestimmte Zytokine ausgelöst. Zwei der den Tod herbeiführenden Faktoren sind Fas-liganden (FasL) oder Tumornekrosefaktor (TNF), sie binden an ihre Rezeptoren und induzieren die Apoptose, womit sie die Zelle innerhalb von Stunden vernichten.

Zytokine sind eine Proteinfamilie, die die Zellproliferation und Differenzierung regulieren, indem sie an ihre spezifischen Rezeptoren an den Zielzellen binden. Zytokine sind in mindestens drei Subfamilien gruppiert, welche auf der Struktur, Cystein-Knoten-Wachstumsfaktoren, Tumornekrosefaktoren, und helikalen Zytokinen basieren (Nagata et al., 1997). FasL gehört zu der TNF-familie (Suda et al., 1993) welche TNF, lymphotoxin, CD30-liganden, 4-1BB-liganden, CD40-liganden, CD27-liganden, und TRAIL (TNF-bezogener Apoptose induzierender Ligand) beinhaltet. TNF induziert die Apoptose und aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B und verschiedene Mitglieder der Caspase-Familie mit ihren Cysteinproteasen.

Diese Caspasen mit ihren zytosolischen Proteasen sind beständige in die Apoptose verwickelte Elemente. ICE (interleukin-1 β converting enzyme) war das erste identifizierte Säugetiergen, welches mit ced-3 der Nematode *C. elegans* gleichzusetzen ist.

Später sind noch viele andere ced-3 Homologe entdeckt worden, mit folgenden Bezeichnungen: Caspase-1 (ICE), Caspase-2 (ICH-1), Caspase-3 (CPP32, Yama, apopain), Caspase-4 (TX, ICH-2, ICERel-II), Caspase-5 (ICERel-III) etc. (**Abb. 4**). Es sind insgesamt 10 verschiedene Proteasen, aber mit dem gleichen Überbegriff „Caspasen“, der die katalytischen Eigenschaften beschreibt, bekannt. Der Anfangsbuchstabe „c“ bezeichnet ihre Cystein-Protease Aktivität und „aspase“ steht für die Fähigkeit, nach Aspartatsäureresten spalten zu können. Eine Schlüsselfunktion kommt der (in **Abb. 6** hervorgehobenen) Caspase-3 (apopain) zu, da sie in einem frühen apoptotischen Stadium aktiviert wird. In ihrer aktiven Form kann sie proteolytisch spalten, andere Caspasen

aktivieren, wichtige zytoplasmatische (D4-GDI) und nukleäre (PARP) Ziele angreifen.

In der ersten Phase einer Immortalisierung wird die Aktivität von p53 blockiert. Das Protein p53 ist ein Tumorsuppressorgen, das als Sicherheitsposten fungiert. Es wird dann eingesetzt, wenn die DNA einer Zelle stark geschädigt ist, um sie davor zu schützen, eine Tumorzelle zu werden (Dickman et al., 1997). Es ist bekannt, daß immortalisierte Zellen ab einer gewissen Anzahl von Passagen (ca. 20) in eine Wachstumskrise hineinkommen. Diese späte Krise könnte durch p73 verursacht werden, ein erst vor kurzem beschriebenes Protein mit einer großen Ähnlichkeit zu dem p53 Protein.

Dieses p53 Tumorsuppressorgen wirkt auf die Zelle ein, indem es entweder die Zellteilung solange inhibiert, bis die geschädigte DNA repariert ist oder es veranlaßt die Zelle, durch die Einleitung eines apoptotischen Prozesses dazu, sich selbst zu vernichten (Dickman et al., 1997).

Bei colorektalen Karzinomen kann die Zellteilung durch ein Protein mit der Bezeichnung p21 inhibiert werden, seine Produktion könnte ebenfalls von p53 getriggert sein (Waldman et al., 1995). Das p73 Protein scheint nicht nur starke Ähnlichkeit mit dem p53 Protein, sondern wahrscheinlich auch ein ähnliches Wirkungsspektrum zu haben. Das p73 Protein scheint also diese wachstumsinhibierenden und apoptosefördernden Effekte gleichermaßen zu besitzen, jedoch sind seine genaue Rolle und die genauen Triggermechanismen hierfür noch unbekannt. Da p73 an einer Stelle auf Chromosom 1 lokalisiert ist, die bei vielen Krebserkrankungen eine Deletion aufweist, wird angenommen, daß es ebenfalls ein Tumorsuppressorgen ist (Versteeg et al., 1995).

Ein Abschnitt von p73 ist der sogenannten „core binding region“ von p53 sehr ähnlich. Eine Vielzahl von Aktivitäten des p53-Proteins hängt von seiner Fähigkeit ab, andere Gene zu regulieren (Polyak et al., 1997) und die „core binding region“ ist die Stelle, mit der es sich an die DNA bindet, um seine Wirkung auszuüben. P73 ist in der Lage, die von p53 beschriebene Fähigkeit im Bezug auf die Einleitung eines apoptotischen Prozesses nachzuahmen, indem es sich über die DNA-Bereiche erstreckt, wo sich normalerweise p53 anheftet (Dickman et al., 1997; Jost et al., 1997).

Zudem ist die Apoptose auch durch bestimmte Faktoren, die von den Mitochondrien freigesetzt werden, zu initiieren. Zu diesen zählen AIF's und Apafs (**Abb. 6**), sie triggern die latente Aktivität der Caspasen (Wyllie et al., 1997). Das bereits erwähnte wichtige anti-apoptotische Bcl-2 Molekül reguliert den Transmembranfluß von Ionen und vor allem bestimmte Moleküle, wie das Bax und ced-4 Protein, welche sehr stark apoptosefördernd wirken, aber erst aktiv werden, wenn ihre Bindung zu Bcl-2 gelöst ist (Zou et al., 1997).

Die darauf folgende mitochondriale Erniedrigung des Lipidgehaltes kann schon 3-6 Stunden nach dem messbaren ROS-Anstieg beobachtet werden. Sie wird von eindeutigen morphologischen (Chromatin-kondensation und -fragmentation) und biochemischen (der Caspase vermittelten Spaltung von PARP=**P**oly-**A**DP-**R**ibose-**P**olymerase) Apoptosesignalen begleitet (Polyak K., et al., 1997). Diese Beobachtungen stimmen mit anderen überein und zeigen, daß einer Verletzung der Mitochondrien schnell die klassischen Apoptosezeichen folgen (Kroemer et al., 1997).

Es gibt mittlerweile viele Beweise dafür, daß Bcl-2 die zum Untergang verdamnten Zellen erfolgreich retten kann, durchaus auch bei kompletter Abwesenheit von ROS (Shimizu et al., 1995; Jacobson et al., 1995). Weiterhin konnte man Belege untermauern, daß die Transaktivierung von p53 bei der Apoptose nicht in allen Zelltypen involviert ist (Caelles et al., 1994).

So läßt sich zusammenfassend sagen, daß die Apoptose ein umfangreiches Netzwerk von vielen ineinandergreifenden Mechanismen ist, von denen ein Großteil Gegenstand der weiteren Forschung sein wird.

1.6 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollten immortalisierte humane Osteoblasten charakterisiert werden. Diese aus dem Kieferknochen eines Erwachsenen gewonnenen Zellen sind mit dem Large-T-Antigen aus Simian Virus 40 transformiert und anschließend mit der Bezeichnung THO-Zellen versehen worden.

Der erste Schritt in der Charakterisierung sollte die Frage beantworten, ob es sich bei diesen immortalisierten Zellen überhaupt noch um Osteoblasten handelt. Weil Osteoblasten *in vitro* morphologisch nicht sicher unterschieden werden können, werden sie indirekt nach typischen Produkten und Merkmalen identifiziert; nämlich durch die Synthese von Kollagen I, Kollagen III, BSP I = Osteopontin, BSP II, Alkalische Phosphatase und Osteokalzin. Es wurden immunzytochemische Experimente durchgeführt, um das Synthesemuster der THO-Zelllinie aufzuzeigen.

Weiterhin ist bekannt, daß primäre Osteoblastenkulturen durch mechanische Belastung ihre Stoffwechselleistung verändern (Produktion von Matrixproteinen) und eine erhöhte Zellteilungsrate zeigen. Unser besonderes Interesse galt dem Reaktionsverhalten der THO-Zelllinie auf mechanische Belastungen im physiologischen Bereich. Mit Hilfe der von Jones D.B. entwickelten „four point bending“ Maschine ist es möglich, definierte homogene Kräfte (hier 3000 μ strain) auf die Zellen auszuüben. Die zelluläre Reaktion sollte mit MTT-Messungen ermittelt werden.

Jones D.B. et al., waren die ersten, die eine durch mechanische Stimulation aktivierte Phosphatidyl-Inositol spezifische Phospholipase C (PI-PLC) in direktem Zusammenhang mit einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration nach Dehnung brachten. Die in dieser Signalkaskade eine interessante Rolle spielende Phospholipase C (PLC) besteht aus neun verschiedenen Isoenzymen, welche in unterschiedlichen Geweben eine jeweils andere Verteilung aufweisen. Unser Ziel war es, mit Western-Blots das Isoenzymmuster in den THO-Zellen festzustellen, im Vergleich zu primären bovinen Osteoblasten, MG63 und SaOS-2 (humane Osteosarkomzelllinien).

Da es ein bekanntes Problem von immortalisierten Zellen ist, daß sie in höheren Passagen oftmals einem Wachstumsarrest unterliegen, war es sehr in unserem Interesse herauszufinden, ob es sich bei der THO-Zelllinie nur um eine Verzögerung der Zellteilungsrate oder aber um einen apoptotischen Prozeß handelte. Hierzu untersuchten wir die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), ein Zink-abhängiges, eukaryotisches, DNA-bindendes Protein, welches spezifisch DNA-Strangbrüche erkennt. PARP dient als Substrat für Apoptose-spezifische Proteasen der ICE-Familie. PARP wird während der Apoptose durch Apopain in Fragmente gespalten und diese Fragmente dienen als frühe spezifische Marker der Apoptose und sind mit Western-Blots nachzuweisen.

Erstrebtes Ziel dieser Arbeit war es, eine immortalisierte humane Osteoblastenzelllinie zu etablieren, die sich zu Versuchszwecken besser, da genetisch homogen, eignet als das Osteoblasten-Zellkulturverfahren mit primären bovinen Zellen. Im Idealfall sollte diese Zelllinie die mühsamen, kostspieligen und nicht-homogenen herkömmlichen Verfahren ersetzen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien und Untersuchungsgut

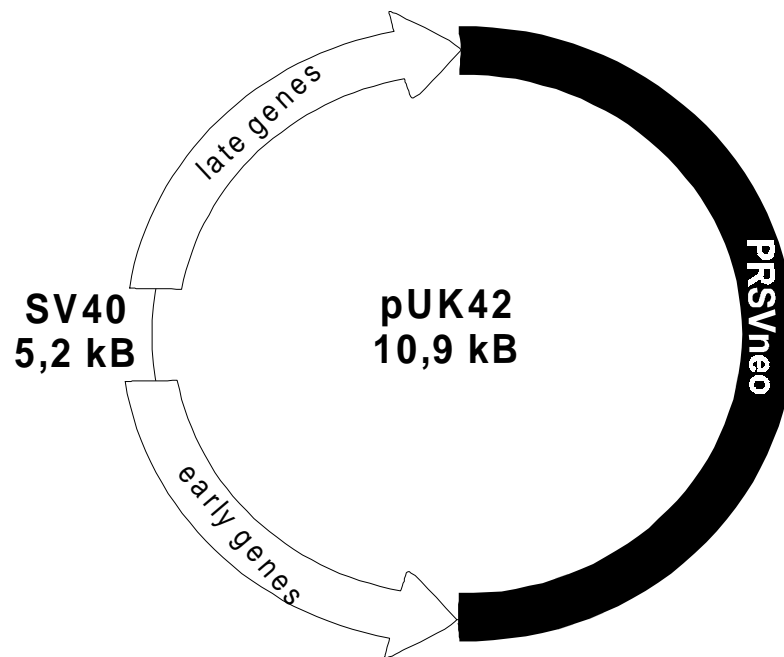
2.1.1 Zellisolierung und Zellkultur

Zur Gewinnung einer humanen Osteoblasten Zellkultur diente Kieferknochen eines Erwachsenen aus der Universitätsklinik in Münster, welcher in dem Laboratorium der zellbiologischen Abteilung der orthopädischen Klinik weiterverarbeitet wurde. Die daraus gewonnenen Spongiosastücke wurden an der Sterilbank unter Verwendung steriler OP-Handschuhe, Mundschutz und sterilisiertem Präparationsbesteck entnommen.

Die gewonnenen Spongiosastücke wurden anschließend 3 mal für jeweils 10 Minuten in einer sterilen Salzlösung (Earl's Lösung I) im Schüttler gewaschen. Es folgte ein 20-minütiger Waschgang in einer mit Antibiotika versetzten, modifizierten Earl's Lösung (II). Die Waschvorgänge wurden bei einer Temperatur von 37° C im Warmraum durchgeführt.

Dann wurden einige (4-5 Stück pro Petrischale) dieser gereinigten Spongiosastücke in die Zellkulturschalen gelegt und mit im Wasserbad vorgewärmten Ham's F10 Medium (III) versorgt. Am Tag nach der Präparation wurde das Nährmedium zum ersten Mal gewechselt, die weiteren Erneuerungen des Nährmediums erfolgten in 2-tägigen Abständen. Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte im Zellkulturinkubator bei gesättigtem Wasserdampfdruck, einer Temperatur von 37° C und einem CO₂ - Partialdruck von 5%.

Die Transfektion dieser humanen Zellen hat in der 4. Passage stattgefunden und wurde in Schottland an der Paisley Universität von C. McDonald durchgeführt. Zur Transfektion wurde das Konstrukt pUK42 (10.9 kb) benutzt, welches aus dem gesamten simian virus 40 (SV 40) Genom (5,2 kb) besteht und mit dem Plasmid pRSVneo ligiert wurde. Dieses Plasmid enthält die Neomycinresistenz codierenden Gene.



Eine konfluente 75 cm² große Flasche wurde einen Tag vor der Transfektion 1:3 gesplittet. Das Plasmid wurde in einer Konzentration von 100 µg/10⁶ Zellen mit Hilfe der Calcium Phosphat Präzipitation eingebracht (Graham und van der Eb, 1973). Die humanen Osteoblasten sind mit pUK42 für 4 Stunden inkubiert worden.

Die Monolayer sind mit serumfreien Medium gewaschen worden, um Präzipitate zu entfernen, bevor das Wachstumsmedium hinzugefügt wurde. Zur Selektion wurde G418 (Geneticin) in einer Konzentration von 1000mg/ml Medium verwendet.

Nach 4 weiteren Passagen ist die Präsenz von SV40 großen T-Antigen durch Immunofluoreszenz ermittelt worden, um nachzuweisen, daß diese Zellen die SV40-DNA exprimieren.

Nach der Transfektion nannte man die immortalisierten humanen Zellen „**THO Zellen**“ (R. Macnair, R. Wilkinson, C. McDonald, 1996).

I Earl's Lösung

50 ml Earl's
450 ml Aqua destillata
3 ml 7,5% NaHCO₃

II Earl's Lösung

500 ml Earl's
1 ml Penicillin G
2 ml Amphotericin
0,25 ml Streptomycin

III Ham's F10-Medium

1000 ml Ham's F10-Medium
100 ml FCS Bone C
10 ml L'Glutamin
2,5 ml Vitamin C
30,3 mg Penicillin
(50.000 U/l)
66,7 mg Streptomycin

2.1.2 Splitten der Zellen

Nach 4-5 Tagen waren die Kulturflaschen konfluent und mußten gesplittet werden, dazu wurde das Medium (Ham's F10) und Trypsin in einem 37° C warmen Wasserbad vorgewärmt.

Das vorhandene Medium in den Kulturflaschen wurde abgesaugt und die Zellen sind mit 10 ml PBS-Lösung gespült worden, um Mediumrückstände zu beseitigen. Anschließend wurde das PBS abgesaugt und durch 1,5 ml Trypsin ersetzt, welches 3-5 min. im 37° C Brutschrank inkubiert worden ist. Die durch das Trypsin abgelösten Zellen sind in 10 ml Ham's F10-Medium (II) aufgenommen und in ein Falkontube überführt worden.

Es wurde 10 min. bei 1000 rpm. zentrifugiert und nach dem Absaugen des Überstandes ist das verbliebene Zellpellet mit 6 ml Ham's F10-Medium resuspendiert worden, um dann auf zwei Flaschen aufgeteilt zu werden. Jede Flasche ist auf insgesamt 15 ml aufgefüllt und wieder in den Brutschrank gestellt worden.

2.1.3 Ablösen und Einfrieren der Zellen

Ab der 12. Passage haben wir die THO Zellen in regelmäßigen Abständen in flüssigem Stickstoff eingefroren, um für nachfolgende Versuche Zellen aus allen Passagen benutzen zu können und um den Bestand von in Kultur gehaltenen Zellen gering zu halten.

Nachdem die Konfluenz der Zellen einer Passage zu beobachten war, wurden Sie nach Absaugen des Mediums mit 10 ml steriler PBS-Lösung (I) gespült und anschließend mit 1,5 ml Trypsin abgelöst, indem wir die Suspension mehrfach mit der Pipette aufgenommen und die Kulturflasche mit der Suspension ausgespült haben, um eventuell noch an der Flasche haftende Zellen durch diesen Vorgang mechanisch abzulösen. Die abgelösten Zellen wurden dann in Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 1000 rpm. zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet ist in 900 µl Medium (II) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt worden. Dieses Kryoröhrchen ist mit 900 µl 20% DMSO-Lösung (III) auf sein Fassungsvermögen von 1,8 ml aufgefüllt worden.

Die Kryoröhrchen sind über Nacht in einer Styroporbox langsam auf -80° C abgekühlt worden, um anschließend in den flüssigen Stickstoff überführt zu werden.

- | | | |
|-----|---|---|
| I | PBS-Lösung (phosphate buffered saline) = | Phosphatgepufferte
Salzlösung |
| II | Ham's F10-Medium | siehe unter 2.1.1; III |
| III | DMSO- (Dimethylsulfoxid) Lösung
(20 %ig) | 4 ml Ham's F10-
Medium
1 ml DMSO (steril
filtrieren) |

2.1.4 Auftauen der Zellen, Zellzahlbestimmung und das Aussetzen der Zellen

Die für einen Versuch benötigten und in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Zellen mußten zuerst aufgetaut werden, indem die Kryoröhrchen sofort in ein bereits auf 37° C vorgewärmtes Wasserbad gestellt wurden. Es wurden 20 ml Ham's F10-Medium in ein Zentrifugenröhrchen vorgelegt, und nach 1-3 min. wurde der Inhalt der Kryoröhrchen mit einer Pasteurpipette aufgenommen und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte ein 10 min. Zentrifugievorgang bei 1000 rpm., nach diesem wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das verbliebene Zellpellet mit 5 ml Ham's F10-Medium resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Coulter-Counter verwendet. Die Nullwerteinstellung des Gerätes erfolgte mittels isotoner Salzlösung. Um die Zellkonzentration festzustellen, wurde von der vorbereiteten Suspension 50 µl in 10ml isotope Kochsalzlösung gegeben, auf einem Rüttler durchmischt und im Counter gezählt. Dabei war darauf zu achten, daß im Counter der Verdünnungsfaktor, korrekt programmiert, auf 200 stand und daß der Leerzählwert auf < 100 fiel. Es wurden 3 Messungen durchgeführt und aus dieser Mehrfachbestimmung der Mittelwert gebildet. Die Zellzahl pro ml der Ursuspension ergab sich dann durch Multiplikation des Mittelwertes mit dem Faktor 200.

Um die gewünschte Konzentration von Zellen in der Lösung zu erhalten, wurde die nach dem Zentrifugieren hergestellte Resuspension entsprechend den Versuchserfordernissen verdünnt. Die benötigten Zellmengen ergaben sich aus der Kapazität der Wells in den verwendeten Platten und der erfahrungsgemäß günstigsten Zelldichte pro Quadratmillimeter.

Die so genau berechneten Zellmengen wurden auf gassterilisierte Platten ausgesetzt und mit zugehörigen Glasdeckelchen abgedeckt. Während des Aussetzens wurde der Behälter mit der Zellsuspension vorsichtig geschwenkt, um ein Sedimentieren der Zellen in der Lösung zu verhindern. Dieses Vorgehen war notwendig, da ein durch Sedimentation bedingtes Verarmen des Überstandes an Zellen folglich zu Unterschieden in der Zellzahl in den einzelnen Wells führen würde. Überschüssige Zellen wurden für eine spätere Verwendung erneut eingefroren.

2.2 Methoden

2.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

ELISA-Reader	Titertek Mustiscan Flow Laboratories
Begasungsbrutschrank für die Zellkultur	Heraeus Instruments
Vier-Punkt-Dehnungsmaschine incl. Motor und Steuereinheit	Eigenentwicklung (Jones D.B. et al., 1991)
Autoklav	Guwina Berlin
Sterilisationsofen	Heraeus Instruments
Gewebekulturschalen für die Zellkultur Ø14 cm	Nalge Nunc International
Gewebekulturflaschen 250 ml	Greiner Labortechnik
Counter Z1	Coulter
Sterilfilter 0,22 µm Porengröße	Schleicher & Schuell
Sterilwerkbank	Gelaire BSB
Zentrifugen	Eppendorf 5415 C
	Heraeus Christ Biofuge A
	Beckman J2-21 M/E Hettich Universal
Rotoren	JA20 Beckman
Phasenkontrastmikroskop	Olympus CK2(BH2-RFCA)

Die zur üblichen Standardlaborausrüstung zählenden Geräte und Materialien werden an dieser Stelle nicht aufgelistet.

Chemikalien

Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck, Serva, Sigma, Fluka, Biolabs, Boehringer Mannheim, Clontech, Biorad, Pharmacia, Gibco BRL, Falcon, Amersham, Stratagene, Calbiochem und Molecular Probes.

2.2.2 Dehnungsapparatur, Dehnungsvorgang, und MTT-Test

Die für diesen Versuch verwendete „four point bending“=Vier-Punkt-Dehnungsmaschine, ist eine Entwicklung von Jones et al., 1991. Ihre Bezeichnung resultiert aus einer zweidimensionalen Modellvorstellung zu den physikalischen und mechanischen Grundlagen der Dehnung. Die Platte ruht im Querschnitt punktförmig auf zwei Widerlagern und die Stempel der Dehnungsapparatur treffen im Querschnitt punktförmig auf die Polycarbonatplatte auf. Das Prinzip beruht auf den alternierenden Auf- und Abbewegungen dieser Stempel, die auf die lateralen Ränder der, auf zwei weiter medial gelegenen Widerlagern ruhenden 9-Well-Dehnungsplatten drücken und somit zu einer Durchbiegung der gesamten Platte führen.

Über einen Hebelarm von einem 500 Watt-Elektromotor wird die ganze Dehnungsapparatur angetrieben. Die Umdrehungszahl pro Minute und somit auch die Frequenz der Dehnungsintervalle ist stufenlos am Elektromotor regelbar. Die für die Dehnung vorgesehene Kraft ist indirekt über die maximale Auslenkung der Platte zu regulieren. Dabei wurde die maximale Auslenkung mit Hilfe der digitalen Schiebelehre bis auf ein zehntel Millimeter genau am Hebelarm justiert und fixiert.

Alle Dehnungsvorgänge sind in einem Warmraum bei 37° C durchgeführt worden. Dabei verweilten alle Platten, einschließlich der ungedehnten Kontrollgruppen, gleichzeitig und gleichlang im Warmraum.

Durchführung MTT-Test

Lösung 1: MTT-Pulver gelöst in PBS (5mg/ml) mit anschließender steriler Filtration bei 0,2 µm Filtergröße (z.B. 50mg in 10ml) bei 2-8° C lagern.

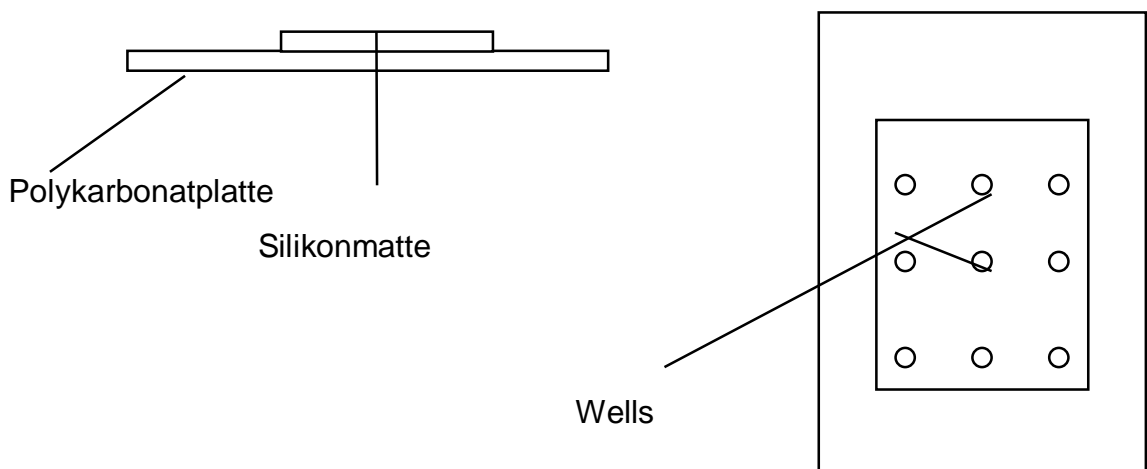
Lösung 2: Lösung 1 + DMEM (Medium ohne Serum, Penicillin, Streptomycin, Glutamin) im Verhältnis 1:10.

Lösung3:

20% Sodium dodecylsulfat (SDS)	20g
50% N,N-Dimethylformamid (DMF)	50ml
30% Wasser aus MilliRQ	50ml

- mit HCL pH auf 4,7 absenken
- filtrieren

Die Polykarbonatplatten (3mm) sind mit Silikonmatten des med. Qualitätsgrades 55 Shore A (mit jeweils 9 Wells) unter Benutzung des Aquarien-Silikonklebers von Dow Corning verklebt worden und über Nacht in H₂O eingelegt und anschließend dampfsterilisiert worden:



Wenn die Petrischalen konfluent bewachsen waren, wurde das Nährmedium abgesaugt und die THO-Zellen wurden mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 10ml Trypsin für 2-3 min bei 37° C inkubiert. Es wurde ein Zentrifugenröhrchen mit 10ml Medium vorbereitet, in welches nun das inkubierte Zell-Trypsin-Gemisch überführt wurde.

Die Zellen wurden nun 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde in 4ml Medium resuspendiert.

Um die Zellkonzentration festzustellen, wurden von der Resuspension 50µl in 10 ml isotoner Kochsalzlösung gelöst und im Counter gezählt. Dabei war darauf zu achten, daß im Counter der Verdünnungsfaktor auf 200 stand und daß der Leerzählwert auf < 100 fiel. Es wurden 3 Messungen durchgeführt. Der Mittelwert wurde für die Verdünnungsberechnungen verwendet.

Für den MTT-Test wurden die Stoffwechselaktivitäten in Abhängigkeit von 5 verschiedenen Konzentrationen und die Abhängigkeit von Belastungen untersucht: Dazu wurden in jeweils 9 Wells (1 Platte) 30.000, 20.000, 10.000, 5.000 und 2.500 Zellen ausgesetzt (1 Well = 0,5 cm²). Ebenso wurde eine Negativkontrolle (je Konzentration 9 Wells) angelegt. Jetzt sind die benötigten Konzentrationen hergestellt worden. Für 2 Platten wurden 2,0 ml Zellsuspension mit einer Konzentration von z.B. 30.000 Zellen / 100µl (incl. 200µl Reserve) benötigt und mit dieser Zellsuspension wurden nun die Wells gefüllt. Dieser Schritt wurde für die anderen benötigten Konzentrationen analog durchgeführt.

1.Tag: Platten wurden gefüllt und bei 37° C inkubiert

2.Tag: das Anwachsen der Zellen wurde überprüft und bei positivem Befund wurden die Zellen mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Dehnung von 4000µstrain (1 strain=Dehnung um 100%) 30 mal belastet.

Für die Belastung mußte der Abstand der Supports und die Dicke der Platte gemessen und in die Formel „Microstrain“ eingegeben werden.

Diese berechnet dann die Auslenkung:

Abstand : 56 mm
Dicke : 2,8 mm
Auslenkung : 0,84 mm

3.Tag: erneute Belastung (nach 24 h).

4.Tag: MTT-Test:

Das Nährmedium wurde abgesaugt und die bereits im 37° C Wasserbad vorgewärmte MTT-Lösung wurde in einer Menge von 100 µl (Lsg. 2) pro Well hinzugegeben. Die Platten wurden für 4h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde zu dem MTT-Medium in jedes Well 100µl bereits auf 37° C vorgewärmtes SDS (Lsg. 3) hinzugegeben und 15 min. inkubiert.

Die Lösungen wurden aufgenommen und in folgender Weise in die Mikrotiter-Platte (96-Loch Platte) eingefüllt:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
leer	nur	unbel	unbel	unbel	unbel	unbel	belast	belast	belast	belast	belast
	Lsg 3	Zellen: 2500	Zellen: 5000	Zellen: 10000	Zellen: 20000	Zellen: 30000	Zellen: 2500	Zellen: 5000	Zellen: 10000	Zellen: 20000	Zellen: 30000

Anschließend erfolgte die photometrische Messung im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570nm gegen einen 630nm Hintergrund.

Zur Bestimmung des Zellwachstums wurden die Zellen gezählt. Dazu wurde das Medium abgesaugt, 100µl Trypsin hinzugegeben und ca. 3 min inkubiert (37° C). Danach wurde im Mikroskop überprüft, ob die Zellen abgekugelt waren. 100µl der Suspension + 10 ml isotone Kochsalzlösung wurden im Zellcounter gezählt. Es war darauf zu achten, daß der Verdünnungsfaktor auf 100 stand.

2.2.3 Immunzytochemischer Antikörpertest

Die zu untersuchenden Zellen (THO) sind immortalisierte humane Osteoblasten und sollten mit dieser immunzytochemischen Untersuchung auf ihre osteoblastentypischen Merkmale geprüft werden. Die Zellorganellenaustattung des Osteoblasten mit einem reichhaltigen Vorkommen von endoplasmatischen Retikulum, dem ausgedehnten Golgi-Apparat und einem hohen Gehalt an Mitochondrien läßt auf eine proteinsynthetisierende Zelle schließen, deren primäre Aufgabe die Sekretionsfunktion ist.

Diese in der Matrix enthaltenen Proteine lassen sich nach funktionellen Aspekten in zwei Gruppen einteilen :

1.Strukturproteine : das Hauptstrukturprotein ist das Kollagen, welches einen Anteil von über 90% der organischen Matrix stellt. Den größten Anteil hiervon hat das Kollagen I, aber auch Kollagen III und Kollagen V kommen in geringen Mengen vor (Bätge et al. 1993).

2.Nichtkollagene, extrazelluläre Matrixproteine : zu dieser Gruppe gehören die Glykoproteine (z.B. Osteonectin, BAG-75), die Proteoglykane (z.B. Biglycan, Decorin), die Gla-Proteine (z.B. Osteocalcin, Martrix-Gla-Protein) und die RGD-Proteine (z.B. Osteopontin = BSP I, BSP II, Fibronectin).

Die THO Kulturen wurden auf Deckgläschen ausgesetzt, um 5 Tage anwachsen zu können. Anschließend wurden die Deckgläschen für 5 min. in TBS-Puffer gelegt. Nach absaugen des Puffers wurden die Zellen in 4° C kaltem Aceton für 90 sec. fixiert. Danach wurde das Aceton entfernt und die Zellen wurden 3 mal mit TBS-Puffer gewaschen. Zum blockieren unspezifischer Bindungen wurden die Zellen 20 min. mit 5% BSA (ohne Sodium-Azide) bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend erneut 3 mal mit TBS-Puffer gewaschen.

Die zu untersuchenden spezifischen Antikörper wurden nun in TBS-Puffer verdünnt und 45 min. bei Zimmertemperatur inkubiert.

1. BSP I (Osteopontin)	Larry Fischer AK	1:100
2. BSP II	Larry Fischer AK	1:100
3. Alkalische Phosphatase	Larry Fischer AK 47	1: 30
4. Prokollagen I	Larry Fischer AK 41	1: 30
5. Prokollagen III	Larry Fischer AK 69	1: 30
6. Osteocalcin	Fitzgerald Ak	1: 50
7. Actin	Boehringer Mannheim	1: 10
8. Vimentin	Boehringer Mannheim	1: 4
9. Kaninchenserum	eigene Herstellung	1:200
10. Mausserum	“	1:200
11. Ziegenserum	“	1:200

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen 3 mal mit TBS-Puffer gewaschen.

Die verwendeten Sekundärantikörper sind mit Alkalischer Phosphatase konjugiert und wurden ebenfalls mit TBS verdünnt und 45 min. bei Zimmertemperatur inkubiert.

1. Anti-Rabbit IgG AP-conjugated	Sigma	1:40
2. APAAP Mouse Monoklonal	Dako	1:20
3. Anti-Goat IgG AP-conjugated	Sigma	1:50

Nach beendeter Inkubationszeit wurden die Zellen erneut 3 mal mit TBS-Puffer gewaschen.

Der sich anschließende Färbevorgang wurde mit Neufuchsin durchgeführt. Die im folgenden aufgeführten Lösungen A-C wurden hierzu gemischt, durch zwei Papierfilter filtriert und anschließend auf die Zellen gegeben. Auf dem Rüttler wurde die Färbelösung nun 10 min. lang entwickelt.

- A. 65µl Stammlösung (5% Neufuchsin in 2 N HCL gelöst)
100µl 4% Na.-Nitrit (pH 8,7)
in ein Eppendorfgefäß geben und 1 min. reagieren lassen!
- B. 11,5mg Levamisole in
31,5ml Tris-HCL Puffer (ph 8,7) lösen!
- C. 16mg Naphtol As-Bi Phosphat in
0,5ml DMF (N,N-Dimethylformamid) lösen!

Die Färbelösung wurde anschließend abgesaugt und im nächsten Schritt wurde Leitungswasser der Reaktion hinzugefügt, um diese abzustoppen. Dieses wurde nun ebenfalls nach einer Einwirkdauer von 1 min. abgegossen und die Deckgläschen wurden jetzt jeweils für 5 min. in einer bestimmten Verdünnung der vorbereiteten Alkoholreihe inkubiert. Die hierfür benötigten Verdünnungen waren 50%, 70%, 90%, 96%, 100%. Die Deckgläschen wurden an der Luft getrocknet und mit Depex-Kleber auf Objektträgern fixiert.

PUFFER:

- TBS: 3,03 g Tris-HCL (Sigma / 3253)
0,7 g Tris-Base (Sigma / 1503)
4,38 g NaCl
pH - Wert auf 7,6 mit 1molarer HCL einstellen,
filtrieren und auf 500ml auffüllen!
(Puffer ist höchstens 4 Tage haltbar).
- TRIS: 1,21 g Tris-Base wurde in 50 ml Aqua destillata gelöst,
und mit HCL auf einen pH von 8,7 eingestellt.

2.2.4 Trypanblaufärbung

Die Zellen wurden nach der Trypsinierung in PBS mit einem pH-Wert von 7,4 aufgenommen. Die Zellkonzentration wurde dann auf 10^5 - 10^6 / ml eingestellt.

Nun wurde eine sterile 0,5%ige Trypanblaulösung angesetzt: 0,9 g NaCl und 0,5 g Trypanblaufarbstoff wurden mit Aqua destillata auf 100 ml aufgefüllt und mit einem 0,45 µm-Filter filtriert. Die sterilfiltrierte Lösung wurde zur Verwendung vorgewärmt und lag im Test mit den Zellen bei einer Endkonzentration von genau 0,18%.

Die Zellsuspension (0,1 ml) wurde mit 3,6 ml PBS (- Ca^{2+} / Mg^{2+}) verdünnt und die vorgewärmte Trypanblaulösung (2,7 ml einer 0,5%igen Lösung) zugegeben. Der Testansatz wurde vorsichtig mit einer Pipette durchmischt und 5 min bei 37° C inkubiert. Anschließend nochmals mit der Pipette gut durchmischt und dann ausgewertet.

Lebende Zellen durften nicht angefärbt sein, während tote Zellen durchgängig blau angefärbt waren. Auch diejenigen Zellen, die nur schwach blau angefärbt waren, wurden als tot betrachtet. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion sehr leicht an Proteine binden kann. Die Farbstoffaufnahme der Zellen ist stark pH-abhängig. Die maximale Aufnahme findet bei pH 7,5 statt. Deshalb sollte der pH-Bereich relativ eng liegen. Weiterhin sind die Temperatur, die Färbedauer sowie die Farbstoffkonzentration relativ kritisch. Bei diesem Test war zu berücksichtigen, daß möglichst ohne Serumzusatz im Medium gearbeitet werden sollte, da sich die Anzahl der gefärbten Zellen bei zunehmender Serumkonzentration drastisch vermindert und deshalb eine vorhandene Lebensfähigkeit vorgetäuscht werden kann. Zudem ist Trypanblau zytotoxisch für die Zellen, sodaß mit zunehmender Inkubationsdauer mit dem Farbstoff ein Anstieg der toten Zellen zu beobachten ist (Lindl & Bauer, Zell-und Gewebekultur).

2.2.5 Northern Blot Analyse

Gesamt-RNA-Isolierung

Gesamt-RNA wurde nach einer adaptierten Methode von (Chomczynski & Sacchi, 1987) aus Zellkulturen isoliert. Diese Methode erlaubt eine Präparation undegradierter RNA innerhalb von 4 Stunden und basiert auf der quantitativen Denaturierung von Proteinen durch Guanidiniumisothiocyanat, einer sauren Phenolextraktion und zwei aufeinanderfolgenden Isopropanolfällungen.

Eine mit Zellen konfluent gewachsene Kulturschale (154 cm²) wurde zunächst zweimal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen, die Zellen dann mit 3 ml Lösung D unter gleichzeitiger Denaturierung zellulärer Proteine lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurden die Zellbestandteile mit einem sterilen Zellschaber von der Platte gelöst und in ein steriles 14 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zur pH-Wertsenkung wurde nun 1/10 Vol. Natriumacetat (pH 4) addiert.

Nach der nun folgenden Proteinextraktion mit 1 Volumen saurem Phenol (pH 4) und 1/5 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol wurde die Lösung für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein kräftiges Schütteln (30 sec.), dann nach Zugabe von 1 ml Chloroform:Isoamylalkohol (49:1) eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 3.000 rpm und Raumtemperatur (Sigma 3K-1).

Die wäßrige Phase wurde in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und einer Isopropanolfällung unterzogen. Die Präzipitation fand bei -20 °C für mindestens 1 Stunde statt. Nachfolgend wurden die gefällten Nukleinsäuren bei 10.000 g und 4 °C für 20 Minuten sedimentiert (Beckman J2-21 M/E), das Pellet in 300 µl Guanidiniumlösung (Lösung D) aufgenommen und in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Nach einer weiteren Präzipitation mit 1 Vol. Isopropanol für mindestens 1 Stunde bei -20° C folgte eine Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge, mit einem Waschen des Pellets mit 75%igem Ethanol und anschließendem Trocknen und Resuspendierung des Pellets in sterilem DEPC-ddH₂O.

Die Reinheit der Probe wurde über den Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ ermittelt. Wurde die Gesamt-RNA im weiteren in enzymatischen Reaktionen verwendet (z. B. cDNA-Synthese), wurde zur Qualitätsbestimmung eine Probe in einem denaturierenden Formaldehyd separiert. Das Verhältnis 18S:28S-Verhältnis sollte bei 1:2 liegen.

Material

Lösung D (Lyselösung)

Guanidinium-Isothiocyanat	4 M
Natriumcitrat	25 mM, pH 7,0
N-Lauryl-Sarkosin	0,5 % (w/v)
2-Mercaptoethanol	0,1 M
Natriumacetat	2 M pH 4,0
Phenol	equilibriert, pH 4,0
Chloroform:Isoamylalkohol	49:1

RNA-Agarose-Gelelektrophorese

RNA-Proben wurden in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen in Horizontal-Elektrophoresekammern aufgetrennt. 2 g Agarose wurden zur Herstellung eines 1 %igen Gels in 160 ml H₂O gelöst und 40 Minuten autoklaviert.

Nach Abkühlung des Gels auf ca. 60 °C erfolgte die Zugabe von 2 ml NaAC (0,5 M)/EDTA (0,1 M) pH 7,2, 2 ml MOPS-Puffer (MOPS: 4-Morpholinpropansulfonsäure; 2 M, pH 7,3), 33 ml 37 %igem Formaldehyd und 10 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml).

10-20 µg RNA wurden gefällt, pelletiert und getrocknet, um anschließend in 10 µl Formamid, 10 µl RNA-Laufpuffer und 3,8 µl Formaldehyd aufgenommen zu werden. Zur Verhinderung der Ausbildung von Sekundärstrukturen der RNA wurde der Ansatz mindestens 15 Minuten bei 65 °C inkubiert. Neben den in die Geltaschen aufgetragenen RNA-Proben wurde in eine freie Tasche Gel-Probenpuffer (10 X) gegeben, um die Laufweiten verfolgen zu können. Die Elektrophorese selbst erfolgte entweder bei 10 V/cm für 4 Stunden oder über Nacht bei 1,5 V/cm.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht zur Dokumentation und Qualitätsbeurteilung fotografiert. Bei einer gelungenen RNA-Präparation und Gelelektrophorese sind 18S- und 28S-rRNA als deutliche Banden zu erkennen.

Material:

Elektrodenpuffer

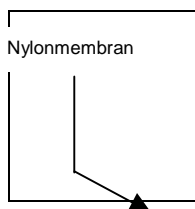
MOPS	20 mM, pH 7,3
EDTA	1 mM, pH 7,2
NaAc	5 mM
Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml)	0,005 %

Northern Transfer

Das Analogon zum Southern-Transfer stellt für die RNA-Übertragung auf eine Membran das Northern-Transferv Verfahren nach Alwine et al., (1977) dar.

Der Transfer erfolgte wie beim Southern-Blot-Verfahren (siehe Abb. 2.3) durch Kapillarkräfte, jedoch wurde das Gel nicht mit De- und Renaturierungslösung behandelt. Als Laufpuffer diente 20 X SSC. Nach dem Transfer, der über Nacht stattfand, wurde die RNA im UV-Licht (254 nm) auf der Nylonmembran fixiert.

Kapillartransfer



DNA-RNA-Hybridisierungen

RNA wurde nach dem Transfer auf eine Nylon-Membran (s. oben) über eine Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden nachgewiesen.

Abb. Blot-Apparatur

Die Skizze zeigt den Transfer von RNA auf eine Nylonmembran. Der Flüssigkeitsstrom erfolgt vom Pufferreservoir nach oben zum Zellstoff, dadurch werden die Nukleinsäuren aus dem Agarosegel auf die darüberliegende Nylonmembran übertragen. Kleine Fragmente (<1000 bp) benötigen 1-2 Stunden, größere (>12 kb) mindestens 15 Stunden.

Die Membran wurde dazu zunächst in eine Folie eingeschweißt und die Prähybridisierungslösung in den entstandenen Beutel hinzugegeben. Die Blockierung der Membran fand durch Inkubation für 3 Stunden bei 42 °C im Schüttelwasserbad statt.

Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung durch ca. 5 ml Hybridisierungslösung je 100 cm² Filterfläche ersetzt. Nach der Inkubation bei 42 °C über Nacht wurde die Membran für 15 Minuten, danach für 45 Minuten

bei Raumtemperatur in 0,1 X SSC/0,1 % SDS (w/v) (nicht stringent: 1 X SSC/0,1 % SDS (w/v)) gewaschen.

Die Membran wurde getrocknet und - unter Verwendung einer Verstärkerfolie - auf einem Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR) exponiert.

Material:

Prähybridisierungslösung	stringent	nicht stringent
RNA-Hybridisierungspuffer 4 X	25 % (v/v)	25 % (v/v)
Formamid	50 % (v/v)	25 % (v/v)
Denhardt's 50 X	20 % (v/v)	20 % (v/v)
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	2 % (v/v)	2 % (v/v)
SDS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)
Sterilfiltration		
Fisch-DNA, frisch denaturiert (10 mg/ml)	2 % (v/v)	2 % (v/v)

Hybridisierungslösung

Prähybridisierungslösung
mit

α - ³² P-dCTP markierte DNA-Sonde	1-3 · 10 ⁶ cpm/ml
--	------------------------------

RNA-Hybridisierungspuffer 4 X

NaCl	30 mM
Tris	60 mM
NaH ₂ PO ₄	65 mM
Na ₄ P ₂ O ₇	1,5 mM
pH 7,5, steril	

2.2.6 Lyse und Extraktion der Proteine

Voraussetzung für die Herstellung der Extrakte ist die Lyse der Zellen und die Herstellung eines Homogenats bzw. die gleichmäßige Suspension der freigesetzten Zellkomponenten im Extraktionspuffer. Bei der mechanischen Zerkleinerung der THO-Zellen und unter der Einwirkung von Detergentien (Triton X-100) werden intrazelluläre Proteasen freigesetzt, welche die zu untersuchenden Proteine partiell spalten können. Um diese Gefahr auszuschalten oder zu minimieren, werden dem Extraktionspuffer Protease-Inhibitoren zugesetzt.

Zu dem Zellpellet wurde 60µl Extraktionspuffer resuspendiert, im Vortex-Mischer kräftig gemischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut gemischt. Das Gemisch aus Proteinen und Zellfragmenten wurde 10 Minuten bei 2500g zentrifugiert, um Zellkerne, Zytoskelett und DNA zu sedimentieren. Der Überstand wird abgenommen und weiterverarbeitet, oder bei –20° C gelagert.

Material:

PBS

Zellschaber

Extraktionspuffer:

Imidazole-HCl pH 6,8	20mM
KCl	100 mM
MgCl ₂	1 mM
EGTA	10 mM
NaF	10 mM
Na-Vanadate	1 mM
Na-Molybdate	1 mM
Calyculin A	1 µM
Triton X-100	1 % (v/v)
Complete-Mini Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	1 Tablette f. 10 ml Extraktionslösung

Gelelektrophorese und Westernblot

Ziel dieser Methodik ist es, die aufgetrennten Proteine aus dem Gel möglichst vollständig auf eine synthetische Membran zu übertragen, so daß ein genaues Abbild des Elektrophoresemusters entsteht. Die auf der Membrantextur gebundenen Moleküle sind dann leicht zugänglich für einen immunologischen Nachweis mit spezifischen Antikörpern. Der Transfer von biologischen Makromolekülen aus Gelen auf Membranen wurde mit Hilfe eines kapillaren Flüssigkeitsstromes erreicht, der durch einen Stapel saugfähiger Filterpapiere (blotting paper) erzeugt wurde. Daher der Begriff " Blotten " für diese Transfermethode (W.A. Eckert, J. Kartenbeck).

Gießen des 5-20% Gradienten-Trenngels

Zuerst mußten die Glasplatten für die Gelgießform mit Alkohol gereinigt werden, um die Apparatur dann zusammenzubauen. Dabei war darauf zu achten, daß die Platten auf dem Gummi gut abdichteten.

Es wurden zwei Mischbehälter mit Magnetrührstäben auf ein Podest gestellt, an Ihre Abflußbahn wurde ein Schlauch angebracht, welcher mit einer Nabelklemme abgeklemmt wurde. Desweiteren war das Ventil zwischen den beiden Reservoirkammern zu schließen.

In die linke Kammer wurden 2,9 ml 5% Polyacrylamid-Stammlösung gegeben und das Ventil daraufhin kurzzeitig geöffnet, bis die Lösung die Luft aus dem Ventil verdrängt hatte. Dabei war darauf zu achten, daß möglichst wenig 5% Lsg. in die 20% Kammer lief (Verdünnungseffekt).

Jetzt wurden 2,9 ml 20% Polyacrylamid-Stammlösung in die rechte Kammer gegeben, die Nabelklemme, welche ca. 0,5- 1 cm nach dem Schlauchanschluß saß, wurde kurz geöffnet, damit sich die Schlauchstrecke bis zur Klemme füllte.

Nun wurden in beide Kammern jeweils 10µl APS (Ammoniumpersulfat) und je 1µl TEMED pipetiert und der Rührstab angestellt. Das Zwischenventil wurde geöffnet und anschließend wurde die Nabelklemme gelöst und die Gelkammer konnte bis zur Markierung volllaufen. Anschließend wurde das Gel mit ddH₂O überschichtet. Das Trenngel war fertig, wenn eine deutliche Trennlinie zwischen Gel und Wasser zu erkennen war (ca. 25-30 min). Das überschüssige Wasser wurde abgegossen und das Gel mehrmals mit ddH₂O gewaschen .

Gießen des Sammelgels

2ml Stacking-Gel Stammlösung wurden mit 20µl APS und 2µl TEMED in einem Falkontube gemischt und zügig mit Pasteurpipetten auf das Trenngel aufgetragen.

Der Teflonkamm wurde langsam bis ca. 0,5cm über dem Trenngel eingeführt (Dauer bis zur Aushärtung ca. 10 min). Der Kamm und eventuelle Blasen wurden vorsichtig entfernt und das Sammelgel mit ddH₂O gespült.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) beruht auf der spezifischen Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G an Proteine. Der Farbstoff bindet über spezifische hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen bevorzugt an Argininreste sowie im geringeren Maße an einige andere basische und aromatische Aminosäurereste (Compton & Jones 1985).

1. Erstellung einer Standard-Eichkurve:

Aus dem als erstes angesetzten Proteinstandard (10% BSA in ddH₂O) wurden

- a) 5µl entnommen und mit ddH₂O in einer Verdünnung von 1:100 auf 500µl aufgefüllt.
- b) 10µl entnommen und mit ddH₂O in einer Verdünnung von 1: 10 auf 100µl aufgefüllt.

Aus der 1:100 Verdünnung (a) wurde in je zwei parallele Mikrolitergefäße folgendermaßen pipettiert:

10µl (= 1µg Protein), 20µl (= 2µg), 40µl (= 4µg), 70µl (= 7µg),
100µl (= 10µg)

Aus der 1:10 Verdünnung (b) wurde entsprechend je 2 x pipettiert:
15µl (= 15µg Protein), 20µl (=20µg).

Alle Proben wurden auf 100µl H₂O auffüllt und zusätzlich eine Leerprobe bestehend aus 100µl H₂O in ein Röhrchen pipettiert.

Zu jedem dieser 100µl Ansätze wurde 900µl Farbreagenz pipettiert und kräftig gemischt (Vortex-Mixer).

Nach etwa 5 min. bis max. 30 min. wurde die Extinktion bei 595nm im Photometer gegen den Leerwert beginnend mit den niedrigsten Proteinkonzentrationen gemessen.

Anschließend wurde aus den Extinktionen der Parallelansätze der Mittelwert gebildet und die Eichkurve erstellt.

2. Bestimmung der Poteinmenge in unbekannten Proben:

Aus dem Ausgangsvolumen wurden mehrere kleine Meßproben (1-10µl) entnommen und mit ddH₂O auf 100µl verdünnt. Dann wurden 900µl Farbreagenz dazugegeben und kräftig gemischt.

A 595 wurde gegen einen Leerwert im Photometer gemessen und anhand der Eichkurve die entsprechende Proteinmenge durch Interpolation bestimmt. Durch Dividieren der bestimmten Proteinmenge durch das Volumen der Meßprobe erhielt man die Konzentration des Proteins in der Ausgangslösung. Anhand des Gesamtvolumens errechnete sich dann die Gesamtmenge an Protein in der Ausgangslösung (W.A. Eckert, J. Kartenbeck, 1996).

Auftragen der Proben

In einer Kammer des Gels ließ man einen Proteinstandard mitlaufen:

25µl β-Mercaptoethanol

475µl Stock Sample Buffer

davon 19µl + 1µl Proteinstandard = 20µl für SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamidgelelektrophorese = 5µl pro Geltasche.

Nachdem die Proteinmengen in den Zelllysaten nach Bradford (s.o.) bestimmt worden sind, orientierte sich der Zusatz an Probenpuffer an dem Zelllysate mit der geringsten Konzentration.

Das Verhältnis Probenpuffer : Zelllysate betrug 1:1

Benötigt wurden 50µg Protein pro Tasche. Waren die Lysate höher konzentriert, wurden sie entsprechend mit Lysepuffer verdünnt. Die Zugabe an Probenpuffer sollte bei allen Proben identisch sein.

Die Proben wurden zusammen mit dem Probenpuffer 5 min. bei 80° C im Wasserbad erhitzt (Denaturierung), während die Platten in die Apparatur eingespannt worden sind.

Das Kopfreservoir ist mit 120 ml, das Bodenreservoir mit 180 ml Laufpuffer aufgefüllt worden. Nun wurden die Proben mit einer feinen Glasspritze in die Kammern gefüllt.

Die Elektrophorese wurde mit 50V / 35mA maximal begonnen. Wenn die Farbfront in das Trenngel eingetreten war, wurde auf 150V / 35mA maximal erhöht.

Wenn die Farbfront die untere Gelebene fast erreicht hatte, wurde die SDS-Page abgeschaltet und das Gel entweder max. 10 min in Coomassie gefärbt und anschließend in Destaining-Solution entfärbt (unter Zugabe eines Schaumstoffstückes), oder für das Blotting zurechtgeschnitten und anschließend direkt 5min in Transferpuffer gelegt.

Western-Blot

In Anlehnung an das Southern Blotting von DNA (Methode nach Southern 1975) wurde der RNA-Transfer scherzhaft als Northern Blotting und der Protein-Transfer als Western Blotting (Burnette 1981) bezeichnet.

Beim SemiDry-Blotting-Verfahren, einer von Kyhse Andersen (1984) entwickelten Methode, ist der Gel-Membran-Sandwich zwischen horizontalen Plattenelektroden angeordnet. Die Puffermenge ist auf getränkte Filterpapiere zwischen den Elektroden und dem Transfersandwich begrenzt, von daher der Begriff "SemiDry".

Dazu wurden 6 Filterpapiere auf die Größe des Gels zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Die Blottingmembran (Nitrozellulose oder PVDF) wurde ebenfalls auf die Größe des Gels zugeschnitten, für 2-3 sec in 100% Methanol und anschließend für 5 min in ddH₂O gelegt. Dann wurden 3 Lagen getränkte Filterpapiere auf die Anode gelegt, darüber die Blottingmembran (unter Vermeidung von Luftblasen) aufgelegt, gefolgt von dem Gel. Wenn das Gel einmal auf der Blotting Membran lag, war es unbedingt zu vermeiden, daß das Gel auf der Membran erneut verschoben wurde, da eine sofortige Diffusion der Proteine beginnt. Darauf folgten 3 Lagen Transferpuffer-getränktes Filterpapier und erneutes Ausrollen mit einer Pipette (Luftblasen). Jetzt wurde der Deckel (Kathode) aufgelegt und die Blottingapparatur an die Stromquelle angeschlossen (20V; max 250mA) und der Blot 45 - 90 min laufen gelassen.

Dabei war die Temperatur auf dem Deckel zu beobachten und falls die Apparatur sich stark erhitze (mehr als handwarm), wurde diese mit einem Kühlkissen gekühlt. Nach der Transferzeit wurde die Stromversorgung unterbrochen und zur Darstellung der Proteinbanden wurde die Blotmembran kurz in ddH₂O gespült und für 3 min in Ponceau S gefärbt und anschließend in mit Essigsäure leicht angesäuertem ddH₂O für ca. 2-3 min gespült. Die Proteinmuster wurden photographiert oder die Markerproteine mit einem wasserfesten Stift markiert. Wenn keine Färbung notwendig war, konnte direkt der Antikörper aufgetragen werden.

Immunchemischer Nachweis von Proteinen auf Blotmembranen

Die Ponceau-Färbung wurde mit TBS bis zur Entfärbung ausgewaschen, nachdem die Standardproteinbanden mit einem wasserfesten Stift markiert wurden. Die PVDF-Membran wurde 15-60 min unter sanftem Rütteln bei Raumtemperatur in einer flachen Schale in Blockierungslösung inkubiert. Während der Inkubation wurde die verdünnte Antikörperlösung hergestellt, indem man den Antikörper in Blockierungspuffer verdünnte. Für 100 - 150 qcm Membrangröße reichten 6 - 10 ml.

Antikörperversdünnung:

Phospholipase C	β_1 – Antikörper	1:2000
Phospholipase C	β_2 – Antikörper	1:5000
Phospholipase C	β_3 – Antikörper	1:3000
Phospholipase C	β_4 – Antikörper	1:2000
Phospholipase C	γ_1 – Antikörper	1:5000
Phospholipase C	γ_2 – Antikörper	1:1000
Phospholipase C	δ_1 – Antikörper	1:2000
Phospholipase C	δ_2 – Antikörper	1:3000
Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase	– AK	1:2000

Nach dem Blockierungsschritt wurde die Membranen kurz in TBS gewaschen. Nun konnte die Blotmembran abtropfen und wurde in einen aufgeschnittenen Folienbeutel gelegt, dreiseitig zugeschweißt, um dann die Antikörperlösung hinzuzugeben. Vor dem Zuschweißen der vierten Seite wurden die Luftblasen so weit wie möglich herausgedrückt.

Die Beutel wurden mit einem Klebeband auf dem Schüttler befestigt und für 1-2 h inkubiert. Dann wurden die Beutel aufgeschnitten und die Membran 3 x 10min mit TBST gespült.

Binden der markierten Sekundärantikörper

Die Inkubationslösung wurde mit entsprechend verdünntem Sekundärantikörper in einer flachen Schale zur Blotmembran gegeben.

Antikörperverdünnung:

Anti – Maus – IgG 1:10000

Anti – Kaninchen – IgG 1:10000

Unter sanftem Schütteln 30 -120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde anschließend 3 x 10 min in TBST gewaschen.

Detektion von Enzymmarkierten Immunkomplexen

Die Membran wurde einmal kurz in TBS ohne Tween gewaschen. Dann wurde die Membran in Substratlösung unter leichter Bewegung 2-15 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Spülen der Membran in TBS mit 20mmol EDTA (Komplexierung der für die Enzymaktivität notwendigen Mg^{2+} -Ionen) abgestoppt. Die Membran mit den darauf sichtbaren Signalen wurde bei Raumtemperatur getrocknet.

Lösungen für die Westernblotanalyse

BCIP-Stammlösung:

0,5 g BCIP in 10 ml 100% Dimethylformamid

NBT-Stammlösung:

0,5 g NBT in 10 ml 70% Dimethylformamid

(Lösung ist bei 4° C mindestens 1 Jahr stabil)

Färbefixierlösung:

(0,2% Coomassie Blau in 45% Methanol, 10% Essigsäure)

Coomassie Brilliantblau R-250 0,4 g

Methanol 90 ml

Eisessig 20 ml

dH₂O 90 ml

Farbstoff wurde sorgfältig unter Rühren gelöst und dann filtriert.

Entfärbelösung:

(5% Methanol, 10% Essigsäure)

Methanol	10 ml
Eisessig	20 ml
dH ₂ O	170 ml

AP-Puffer:

<u>Endkonzentration</u>	<u>Ansatz</u>
100 mM NaCl	5,84 g
5 mM MgCl ₂	0,48 g
100 mM Tris	12,1 g

diese Ansätze wurden in 800 ml ddH₂O gelöst und mit 1N HCl wurde der pH-Wert auf 9,5 eingestellt, dann auf 1 Liter auffüllt.

TBS-Lösung:

8 g NaCl
0,2 g KCl
2 g Tris

in 800 ml ddH₂O gelöst, mit HCl den pH-Wert auf 7,4 einstellt, dann auf 1 Liter auffüllt und anschließend autoklaviert.

TBS mit 20 mM EDTA:

(50 ml TBS und 0,2 ml 0,5 M EDTA-Stammlösung gemischt).

Färbelösung:

Diese mußte unmittelbar vor dem Enzymnachweis angesetzt werden.

66 µl NBT-Stammlösung mit
10 ml AP-Puffer gut mischen und
33 µl BCIP-Stammlösung dazugeben.

Die Lösung sollte innerhalb einer halben Stunde benutzt werden.

Acrylamid-Bis-Stammlösung für Trenngele nach Laemmli:

29,2 g Acrylamid

0,8 g Bis

mit ddH₂O auf 100 ml auffüllen und durch leichtes Rühren lösen und dann filtrieren. In einem dunklen Behälter ist die Lösung 2 Monate haltbar, bei längerer Lagerung bildet sich zunehmend als Hydrolyseprodukt Acrylsäure; diese polymerisiert mit Acrylamid und verschlechtert dadurch die Trenneigenschaften der Gele.

SDS-Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS, 10% Glycerin, 20 mM DDT, 1 mM EDTA, 0,01% Bromphenolblau)

1,5 g Tris

2 g SDS

10 g Glycerin

37 g EDTA oder 200 µl aus 0,5 M Stammlösung

2 ml DDT aus 1 M Stammlösung

in 50 ml ddH₂O lösen und mit 1 N HCl auf pH 6,8 einstellen, 2 ml Bromphenolblau-Stammlösung (0,5% in ddH₂O) dazugeben, auf 100 ml mit ddH₂O auffüllen.

Trenngelpuffer (Endkonz. im Gel: 375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS)

4-fach konzentriert:

18,17 g Tris

0,4 g SDS

in 50 ml ddH₂O lösen, mit 1 N HCl auf pH 8,8 einstellen, auf 100 ml mit ddH₂O auffüllen und filtrieren.

Sammelgelpuffer (Endkonz. im Gel: 125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS)

2-fach konzentriert:

3,0 g Tris

0,2 g SDS

in 50 ml ddH₂O lösen, mit 5 N HCl auf pH 6,8 einstellen und auf 100 ml mit ddH₂O auffüllen und filtrieren.

Sammelgel 5%:

1,76 ml	Acrylamid-Bis (30%)
3,2 ml	ddH ₂ O
5 ml	Sammelgelpuffer
0,05 ml	Ammoniumpersulfat (10%)
0,01 ml	TEMED

Trenngel 5%-20%:

	5%	20%
Acrylamid-Bis (30%)	2,5 ml	10 ml
ddH ₂ O	8,7 ml	- - - -
Trenngelpuffer	3,75 ml	3,75 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	0,04 ml	0,04 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml
Saccharose (50%)	- - - -	2,25 ml

Diese beiden Lösungen wurden in einem Zweikammersystem gemischt, um so ein 5%-20%iges Gel gießen zu können.

Laufpuffer nach Laemmli:

(25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS)

3 g	Tris
14,4 g	Glycin
1,0 g	SDS

der Ansatz wird in 1000 ml ddH₂O gelöst mit einem pH-Wert von 8,8%.

Transferpuffer:

(25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Ethanol)

3 g	Tris
14,4 g	Glycin
200 ml	Ethanol

der Ansatz wird in 1000 ml ddH₂O gelöst.

Blockierungslösung:

Ansatz einer 5% Blockierungslösung.

300 ml	TBS
300 µl	Tween (0,1%)
15 g	BSA (Bovines Serum Albumin, 5%)

3. Ergebnisse

3.1 Analyse des immunzytochemischen Antikörpertests

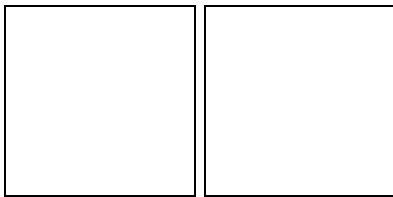
Die von uns untersuchten transformierten humanen Osteoblasten (THO) sind mit dem Simian Virus 40 immortalisiert worden. T-Antigen ist das Initiator-Protein des SV40 Replikons. Das SV40 Virus kann die Zellen transformieren, ohne daß eine Virusvermehrung in den Zellen stattfindet, da die SV40-DNA in das Wirtsgenom integriert wird. Wenn bei diesem Integrationsvorgang das Gen für das T-Antigen intakt bleibt und aktives T-Antigen gebildet werden kann, kommt es zu einer Veränderung des zellulären Wachstumsverhaltens.

Die Zelle ist nun transformiert, d.h. von einer normalen in eine Tumorzelle überführt worden. Die Zellen produzieren ein für den Wirtsorganismus fremdes Protein, das T-Antigen, gegen das *in vivo* Antikörper gebildet werden können, was jedoch unter Zellkulturbedingungen *in vitro* nicht der Fall ist. Dieses T-Antigen leitet die Replikation der Zell-DNA ein und es kommt somit zu einer Zellvermehrung, die sich den natürlichen Wachstumsbedingungen entzieht.

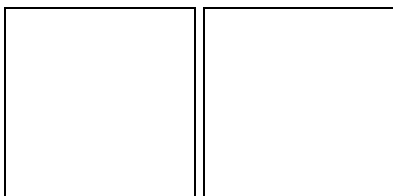
Es ist bekannt, daß primäre bovine Osteoblasten bestimmte Proteine synthetisieren, und da sie *in vitro* morphologisch nicht sicher zu unterscheiden sind, werden sie indirekt anhand dieser typischen Produkte und Merkmale identifiziert. Zur näheren Beschreibung dieser Strukturproteine bzw. nichtkollagenen extrazellulären Matrixproteine siehe unter 1.1.

Wir haben nun mit immunzytochemischen Antikörpertests das Synthesemuster unserer immortalisierten humanen Osteoblasten ermittelt (**Abb. 1**). Es zeigte sich, daß die Transfektion mit dem SV40 großen T-Onkogen die Proliferation der Zellen induziert, ohne daß es zu einem Verlust von Kollagen I, Kollagen III, BSP I, Alkalischer Phosphatase und Osteokalzin kommt. Da wir mit dieser Methode, bei der mit Neufuchsin gefärbt wird, ein nur recht schwaches Signal der Osteokalzinproduktion erhalten haben, sind wir zu einem sensitiveren Verfahren, der Northern-Analyse übergegangen. Mit Hilfe des Northern-Blots konnten wir ein deutliches Osteokalzinsignal in der 15. und 17. Passage detektieren (**Abb. 3**). Die Phänotypisierung ergab insgesamt eine Präsenz typischer Osteoblastenmarker der mittleren bis späten Differenzierungsphase.

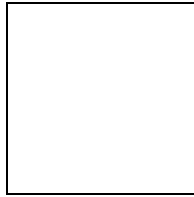
Abb. 1: Immunzytochemischer Antikörpertest der Osteoblastenmarker mit Neufuchsinrot (mit * = detektiert)



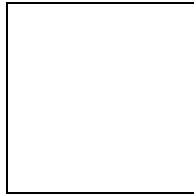
*Actin als Positivkontrolle * (Präparat VIII 2/9)*



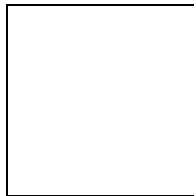
*Vimentin als Positivkontrolle * (Präparat VIII 2/10)*



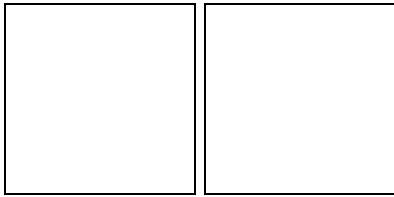
*Kaninchenserum als Negativkontrolle
(Präparat X 1/1)*



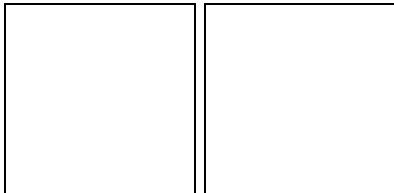
*Mausserum als Negativkontrolle
(Präparat X 1/2)*



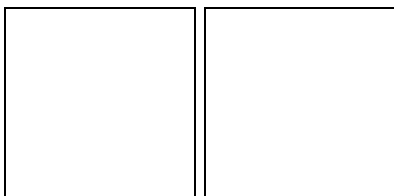
*Ziegenserum als Negativkontrolle
(Präparat X 1/3)*



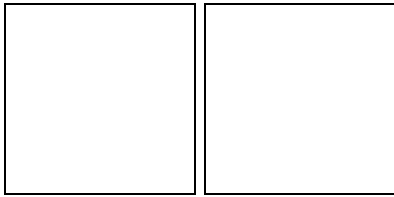
*BSP I (Osteopontin) - Detektion * (Präparat X 1/4), 91 % positiv*



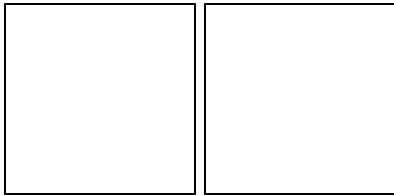
BSP II - keine Detektion (Präparat IX 1/5), 8 % positiv



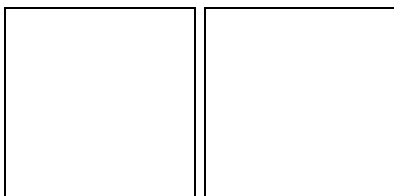
Osteokalzin - schwache Detektion (Präparat X 1/6), 65 % positiv*



*Kollagen I - Detektion * (Präparat X 2/7), 82 % positiv*



*Kollagen III - Detektion * (Präparat X 2/8), 65 % positiv*



*Alkalische Phosphatase - Detektion * (Präparat X 2/9), 79 % positiv*

3.2 Beschreibung des Osteokalzin-Northern-Blots

Die Northern Analyse ist im Vergleich zu immunzytochemischen Experimenten, bei denen nur ein schwaches Osteokalzinsignal in THO-Zellen detektiert werden konnte, wesentlich sensitiver. RNA-Proben der THO-Zellen sind in einem denaturierten Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt worden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht zur Dokumentation und Qualitätsbeurteilung fotografiert.

In der gelungenen RNA-Präparation und Gelelektrophorese sind die 18S- und 28S-rRNA (**Abb. 3**) als deutliche Banden erkennbar.

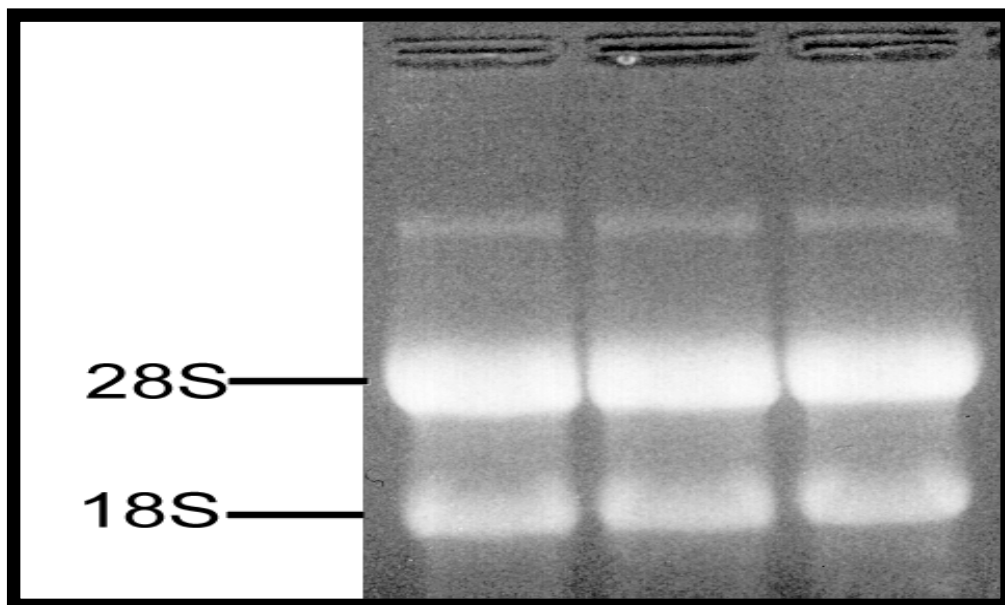


Abb. 3: Eine deutlich zu erkennende 18S- und 28S-rRNA im Gel unter UV-Licht-Bestrahlung.

Anschließend wurde die RNA durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen. Die RNA wurde über Hybridisierung durch eine, mit P ³² markierten DNA-Sonde für Osteokalzin, nachgewiesen und auf einem Röntgenfilm exponiert (**Abb. 4**).

15. Passage

17. Passage

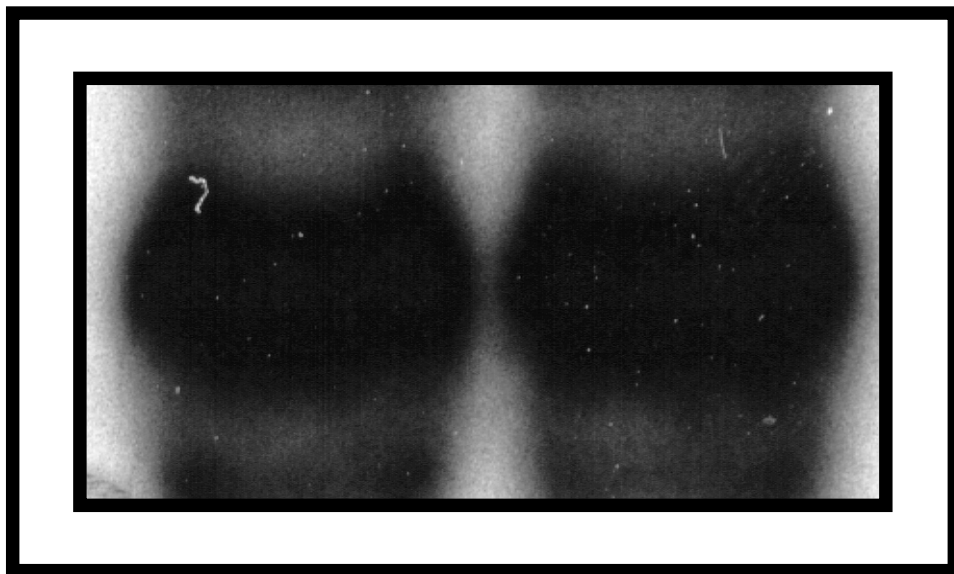


Abb. 4 : *Eindeutige und starke Signale einer Osteokalzinproduktion in THO-Zellen der 15.- und 17. Passage im Röntgenfilm.*

3.3 Darstellung der Vitalität mit der Trypanblaufärbemethode

Zur Transfektion der THO-Zellen wurde das Konstrukt pUK42 benutzt, welches aus dem gesamten SV40-Genom besteht und mit dem Plasmid pRSVneo ligiert wurde. Dieses Plasmid enthält die für die Geneticinresistenz (G418) codierenden Gene. Die Zellen wurden einer hohen G418 Konzentration von 1000 µg/ml ausgesetzt und anschließend wurde ihre Vitalität durch eine Trypanblaufärbung geprüft. Dieser Test beruht darauf, daß bei lebenden Zellen bestimmte Farbstoffe nicht in das Zellinnere gelangen können, während tote Zellen sich mit dem Farbstoff anfärben.

In der THO-Zelllinie ist keine Anreicherung des Farbstoffes festgestellt worden (**Abb. 5**), wodurch ihre Vitalität nach Antibiotikaexposition und somit ihre Antibiotikaresistenz belegt werden konnte.

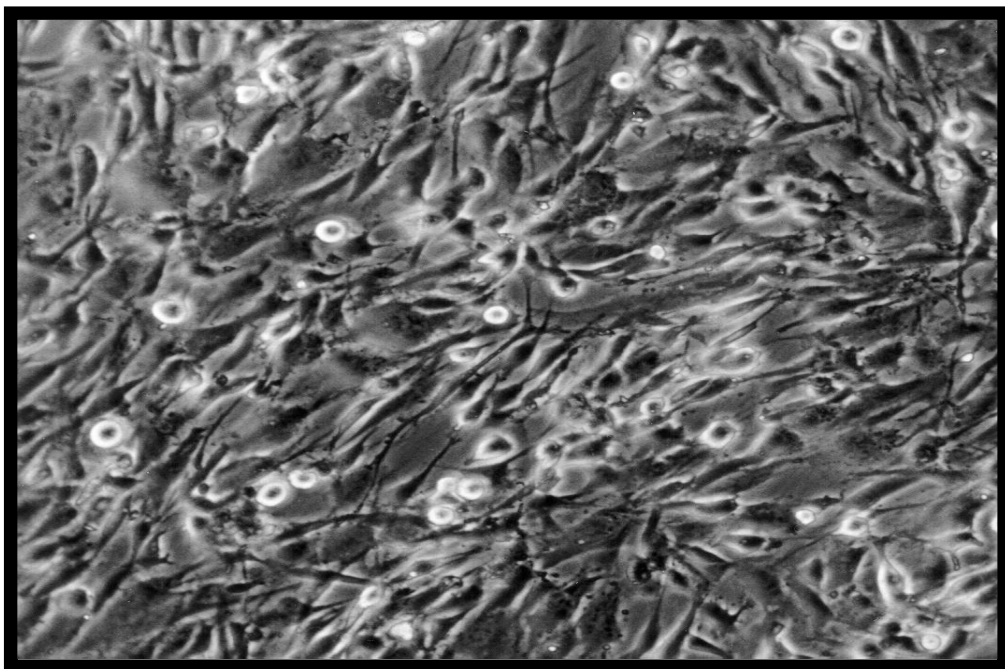


Abb. 5: Es ist keine Trypanblaufärbung der Zellen nach Geneticin 418-Exposition zu erkennen, d.h. die Zellen leben und die Antibiotikaresistenz ist vorhanden.

3.4 Ergebnisse und graphische Auswertung der MTT-Messungen

Nachdem die THO-Zellen bestimmten Belastungen im physiologischen Bereich (3000 μ strain) ausgesetzt worden sind, wurden MTT-Messungen durchgeführt, um die zelluläre Reaktion zu ermitteln.

Der MTT-Test ist ein von Mosmann entwickeltes quantitatives, spektroskopisches Assay zur Bestimmung von Zellproliferation, der Vitalität und Zytotoxizität (Mosmann, 1983).

MTT (3-4,5-Dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) ist ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz, welches in phenolfreiem Medium eine gelbliche Lösung ergibt. Gelöstes MTT wird durch (mitochondriale) Dehydrogenaseenzyme mittels Spaltung des Tetrazoliumringes in lilafarbenes Formazan umgewandelt. Unter dem Mikroskop sind lilafarbene Formazankristalle zu sehen (**Abb. 6**).

Die entstehenden unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen können photometrisch gemessen werden und erlauben Rückschlüsse auf die Aktivität der mitochondrialen Succinatdehydrogenase (Slater et al., 1963). Die Succinatdehydrogenase läßt als Bestandteil des Zitratzyklus Rückschlüsse auf die Aktivität der Zellen im Sinne von Wachstum und Proliferation zu.

Die optische Dichte (570 nm) wird als Funktion der Konzentration des umgesetzten Farbstoffes bestimmt, wobei sie direkt zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen in Kultur korreliert (Mosmann, 1983).

Der Zitratzyklus ist über die Lieferung von Wasserstoffionen direkt mit dem Energiestoffwechsel der Zelle durch die biologische Oxidation verknüpft, eine weitere physiologische Aufgabe besteht in der Bildung von ATP als Energieträger (Buddecke et al., 1989). Dabei kann nur die aktive mitochondriale Succinatdehydrogenase lebender Zellen eine Umwandlung des Farbstoffes herbeiführen.

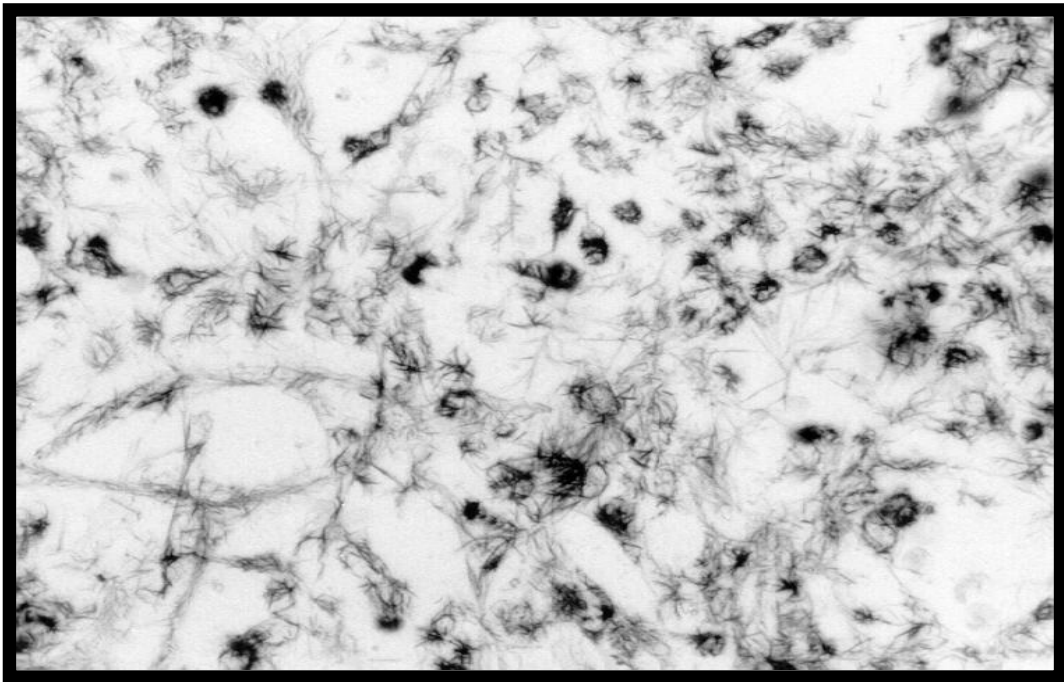


Abb. 6: *MTT-Test mit THO-Zellen in der 15. Passage, 40.000 Zellen/cm², auf dem Foto sind sehr gut die gebildeten Formazankristalle zu erkennen, sie sind durch Spaltung des Tetrazoliumrings entstanden.*

Bei dem durchgeführten MTT-Test wurde jeweils eine Platte mit 9 Wells nicht mit dem wasserlöslichen Tetrazoliumsalz inkubiert. Diese Zellen haben die gleichen Belastungszyklen durchlaufen und dienen zur Zellzahlbestimmung durch einen Coulter-Counter. Pro Well sind jeweils 3 Messungen durchgeführt worden, von denen dann der Mittelwert berechnet wurde. Für diese Messung sind THO-Zellen der 15. Passage in einer Konzentration von 40.000 Zellen/cm² ausgesetzt worden. In **Abb. 7** sind die Messergebnisse graphisch dargestellt. Es konnte bei den belasteten Zellen ein Zuwachs von 14 % gegenüber den nicht-belasteten Kontrollen verzeichnet werden.

Im folgenden sind die errechneten Zellmengen von belasteten und unbelasteten THO-Zellen durch den Mittelwert von 3 Messungen aufgeführt. Um die statistische Korrektheit dieser Messungen zu belegen, ist ein Wilcoxon-Mann-Whitney Test für zwei unterschiedliche Proben der gleichen Größe durchgeführt worden (Steel & Torrie et al., Principles and Procedures of Statistics).

	Unbelastet	Belastet
1	22.900	27.313
2	22.053	29.486
3	25.153	26.413
4	25.713	27.200
5	23.526	27.453
6	23.606	26.980
7	25.526	26.986
8	22.100	26.846
9	22.833	25.433

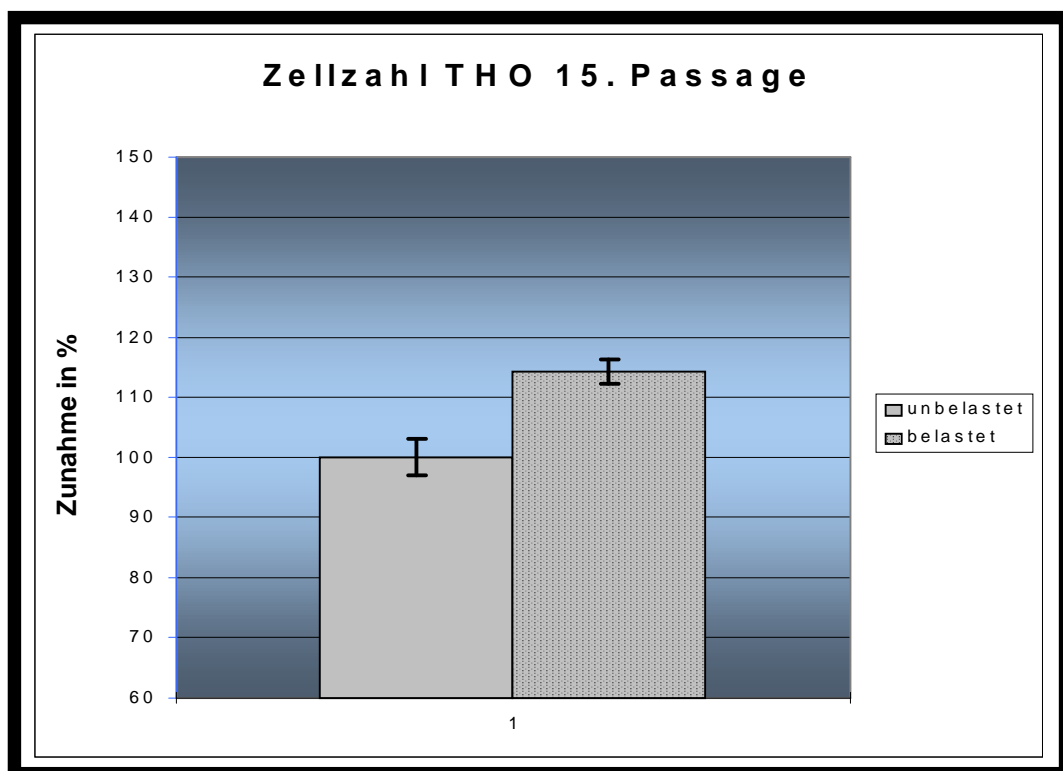


Abb. 7: Bestimmung der Zellzahl im MTT-Test, unbelastete Zellen sind mit 100 % im Diagramm eingetragen und die belasteten zeigen mit 114 % einen deutlichen Zuwachs.

Das im MTT-Test gebildete lilafarbene Formazan kann nun fotometrisch gemessen werden und gibt Aufschluß über die Aktivität der mitochondrialen Succinatdehydrogenase der belasteten Zellen im Vergleich zu den unbelasteten Kontrollen. Im folgenden sind die bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessenen Werte im einzelnen aufgeführt und in **Abb. 8** graphisch dargestellt. Die belasteten Zellen zeigen hier eine deutliche Extinktionszunahme von 30 %.

	Unbelastet	Belastet
1	0,218	0,246
2	0,227	0,256
3	0,238	0,265
4	0,229	0,272
5	0,235	0,260
6	0,228	0,292
7	0,223	0,278
8	0,227	0,280
Mittelwert =	0,228	0,269
- Leerwert =	0,133	0,174
	(0,095)	

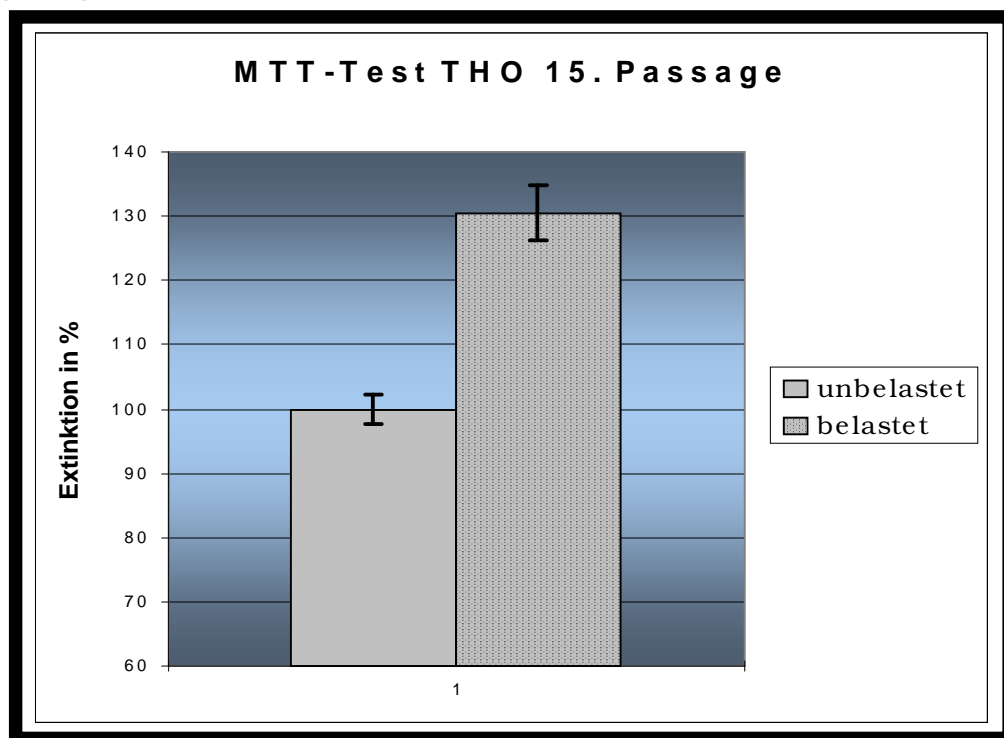


Abb. 8: Extinktionszuwachs von 30 % im MTT-Test.

3.5 Darstellung des Phospholipase C Verteilungsmusters in THO-Zellen, primären bovinen Osteoblasten, MG-63 Zellen und SaOS-2 Zellen

In der Phosphatidyl-Inositol-Kaskade spielt die Phospholipase C (PLC) eine entscheidende Rolle. Es sind neun Isoenzyme der PLC bekannt, welche in unterschiedlichen Geweben eine jeweils andere Verteilung aufweisen. Folgend ist das Isoenzyymmuster der THO-Zelllinie dargestellt im Vergleich zu primären bovinen Osteoblasten (POB's) und den humanen Osteosarkomzelllinien MG-63 und SaOS-2. Als erster Schritt muß die genaue Proteinmenge in einem Lysat festgestellt werden, um in der anschließenden Gelelektrophorese eine homogene Auftrennung der verschiedenen Proben zu erhalten. Exemplarisch sei hier die Proteinbestimmung nach Bradford 1976; Eckert, Kartenbeck 1996 anhand der THO-Zellen dargestellt (**Abb. 9**).

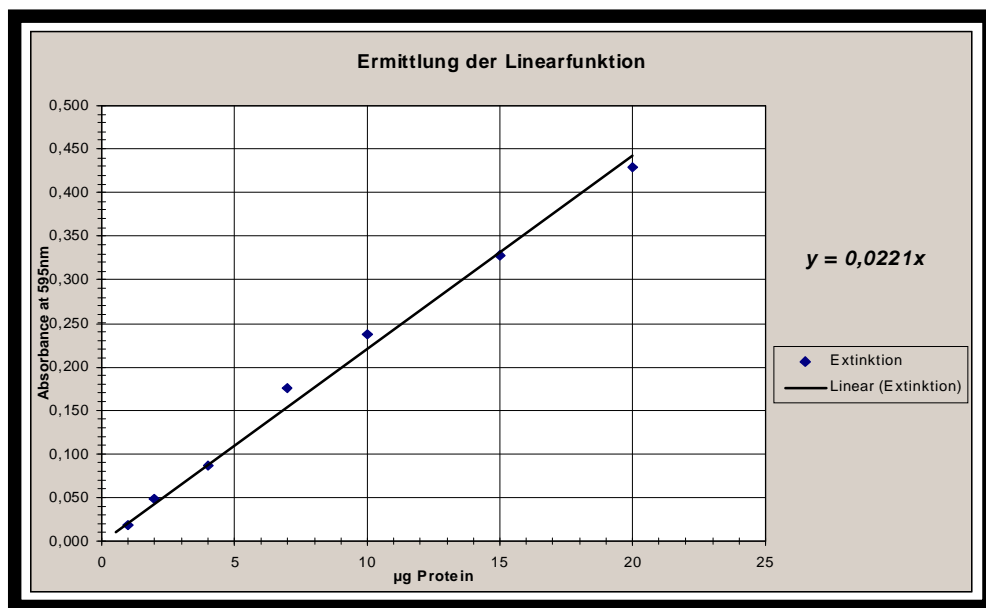


Abb. 9: Bradford-Protein-Assay für Western-Blot.

µg Proteinstandard	Extinktion	µl Lysat	Extinktion	µg/µl Lysat
1	0,019	1	0,047	2,130
2	0,049	2	0,055	1,240
4	0,087	5	0,181	1,640
7	0,176	10	0,397	1,790
10	0,238			
15	0,328			
20	0,429			
				<u>X= 1,7µg/µl</u>

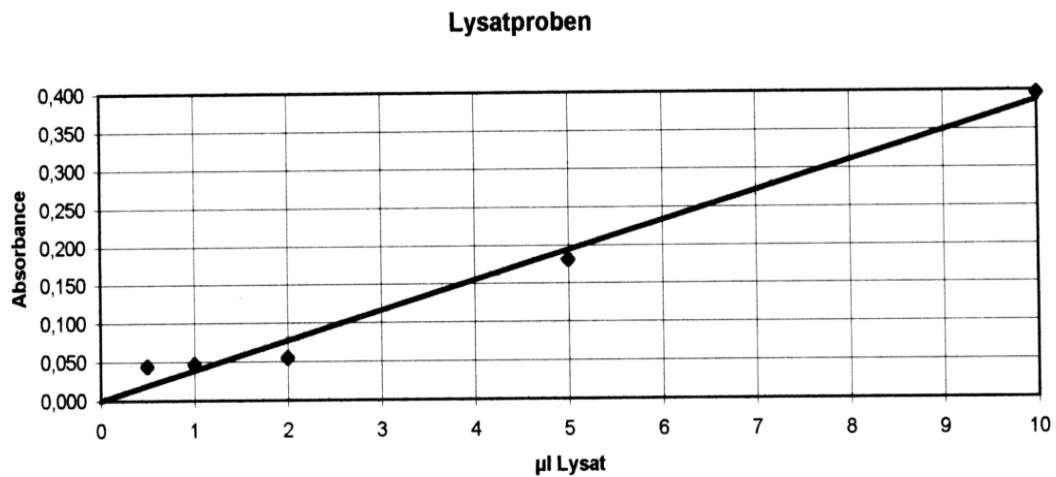


Abb. 9: Lysatproben der THO-Zellkultur. Für die Bestimmung des Proteingehaltes in den Zelllysaten gilt: $y = \text{Extinktionswert} / 0,0221$. Dieser Wert dividiert durch die μl Zelllysate ergibt die Proteinkonzentration/ μl Zelllysate.

In dieser Probe befinden sich $1,7 \mu\text{g Protein}/\mu\text{l}$; und um eine Tasche des Elektrophoresegeles mit $70 \mu\text{g}$ Protein zu füllen, benötigten wir $41 \mu\text{l}$ dieses Zelllysates ($70 \mu\text{g} : 1,7 \mu\text{g} = 41 \mu\text{l}$) und nochmals die gleiche Menge an Probenpuffer. In **Abb. 10** ist eine homogene Auftrennung der Proben in einem 5-20 %igen Polyacrylamid-Gradientengel zu sehen. Zur sofortigen Überprüfung der Auftrennung der Proben im Gel, ist dieses mit Coomassie-brilliant-blau nach der Elektrophorese gefärbt worden.

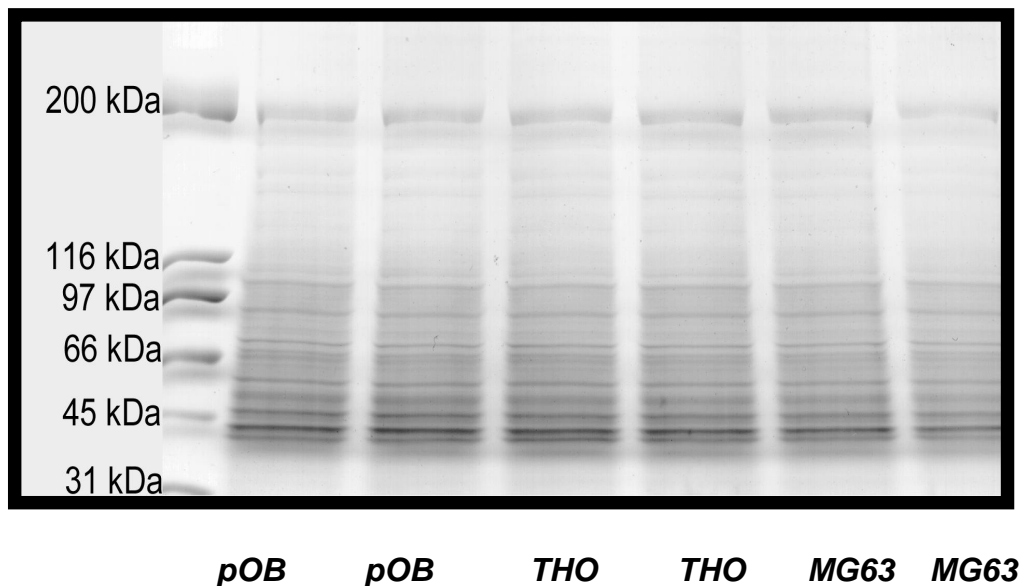


Abb. 10: Zur Überprüfung der Probenhomogenität eines 5-20 %igen Polyacrylamidgradientengels dient die **Coomassie-blau-Färbung** nach der Elektrophorese.

Die Proteinbanden aus dem Gel sind durch „Semi-dry-blotting“ auf eine PVDF-Membran übertragen worden. Wir haben nun bestimmte Muster enzymmarkierter Immunkomplexe detektieren können. Die THO-Zellen haben ein identisches Isoenzymmuster mit den MG63-Zellen gezeigt. Es konnten die PLC's: $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$ und $\delta 2$ im Zytoplasma der beiden Zelllinien dargestellt werden (**Abb. 11 a/b**).

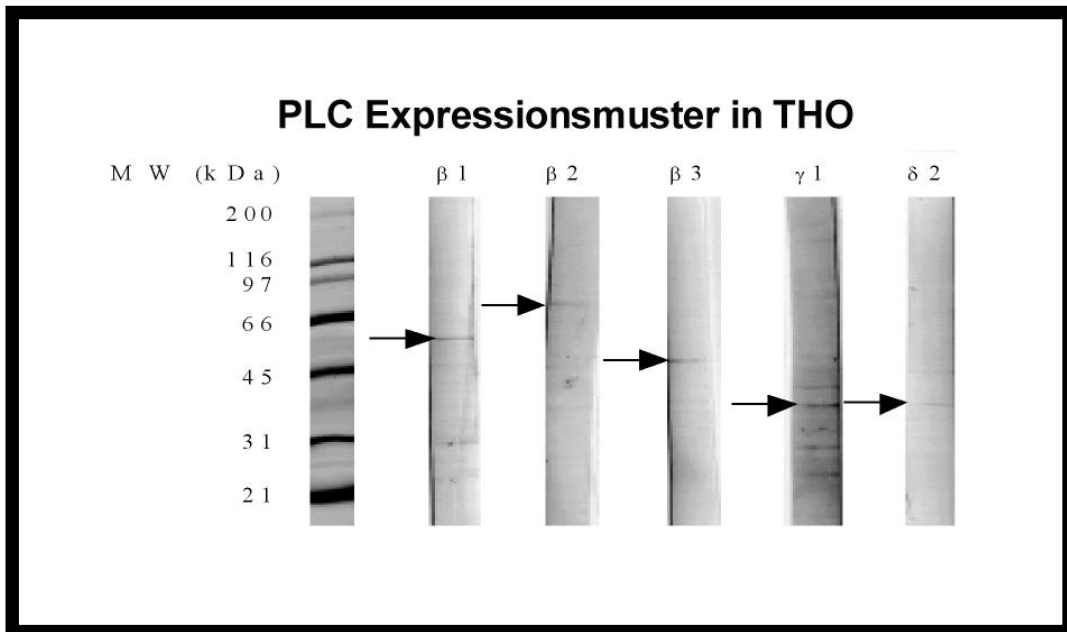


Abb. 11a: PLC-Isoenzyme in THO-Zellen.

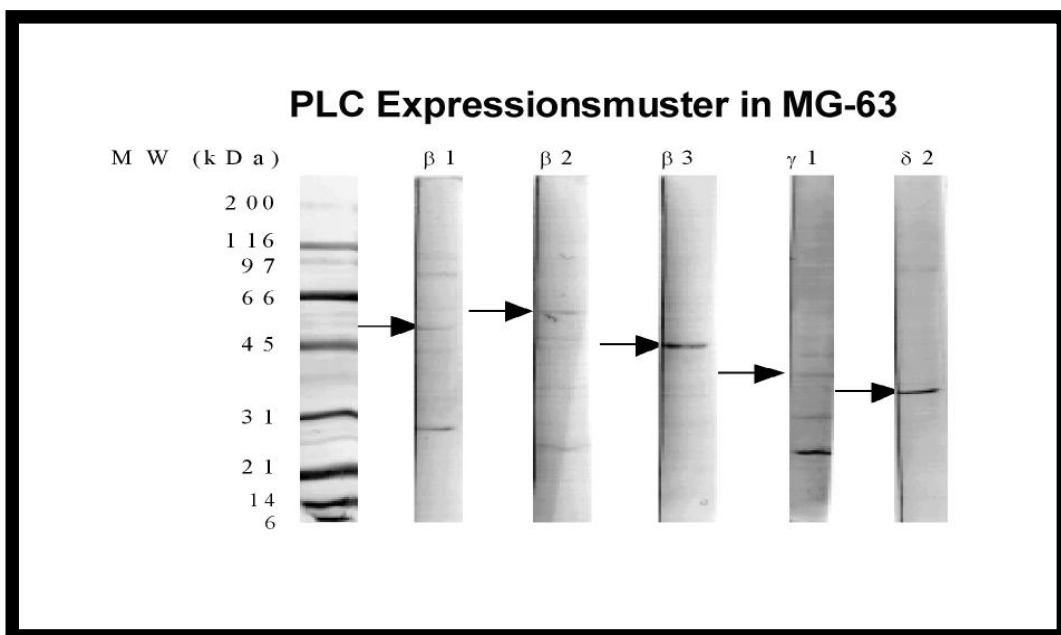


Abb. 11b: PLC-Isoenzyme in MG63-Zellen.

Im Vergleich der beiden humanen Zelllinien und dem bei ihnen gefundenen PLC-Verteilungsmuster zeigt sich eine Veränderung in Bezug auf die primären bovinen Zellen. Die primären Osteoblasten (POB's) exprimieren $\beta 4$ an Stelle von $\beta 3$ und $\gamma 2$ an Stelle von $\delta 2$. Die anderen Isoenzyme gleichen dem Muster der humanen Zellen: $\beta 1$, $\beta 2$, und $\gamma 1$ (**Abb. 12**).

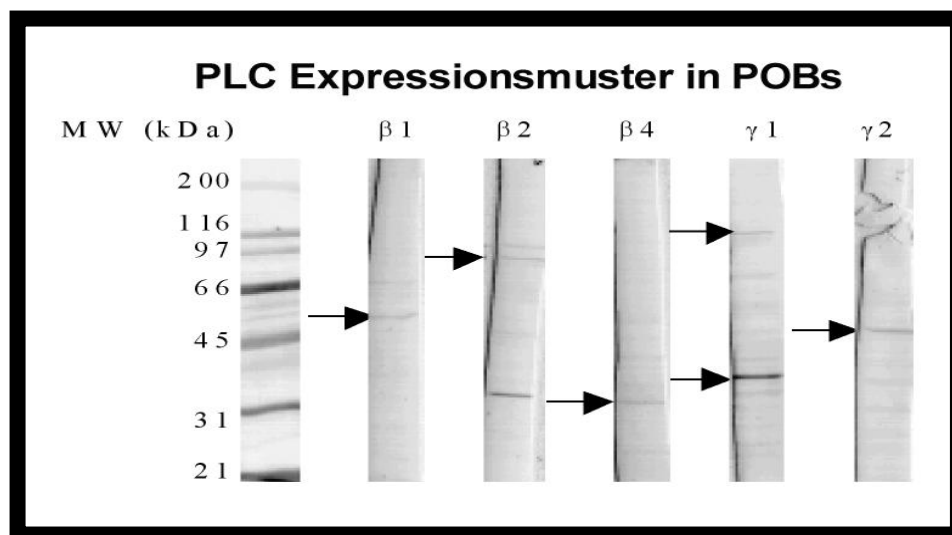


Abb. 12: PLC-Isoenzyme in primären bovinen Osteoblasten.

Zusätzlich haben wir noch eine nicht-mechanosensitive Zelllinie, die Osteosarkomazellen SaOS-2 auf ihr PLC-Isoenzymmuster untersucht. Hier konnten Signale bei $\beta 1$, $\gamma 1$ und $\delta 2$ detektiert werden (**Abb.12a**).

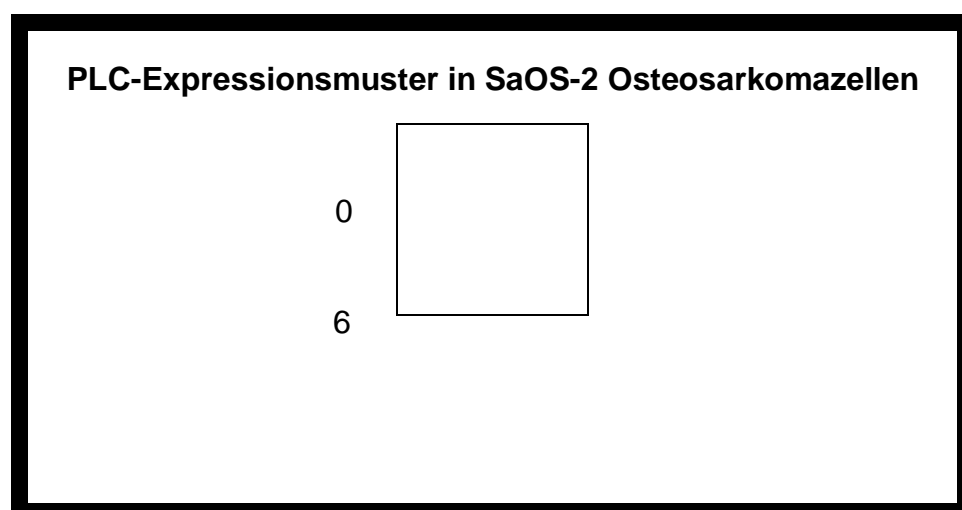


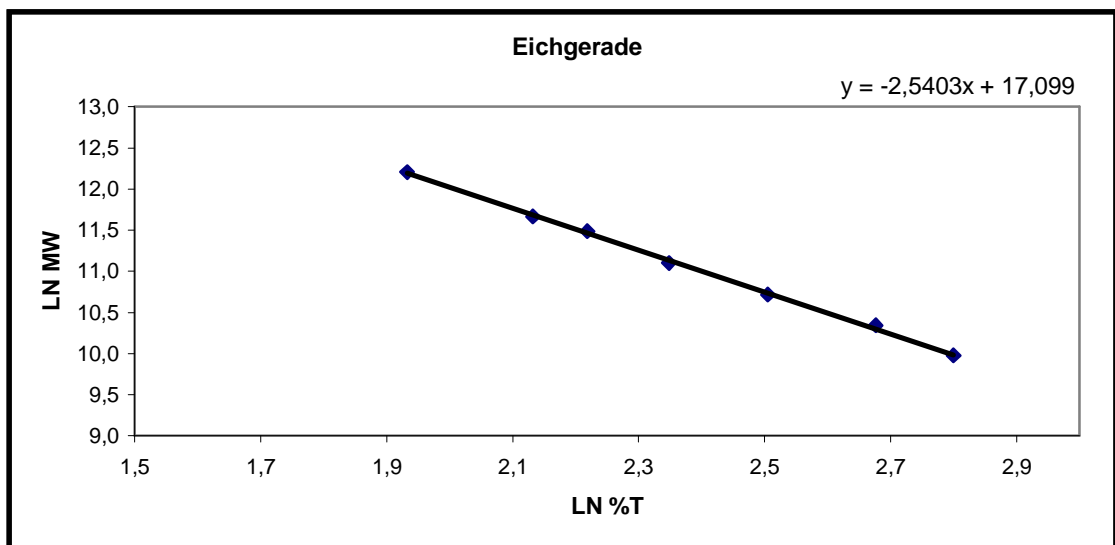
Abb. 12a: PLC-Isoenzyme in Osteosarkomazellen (SaOS-2).

**Molekülmassenberechnung der PLC-Isoformen
durch Interpolation mit einer Eichgeradenfunktion
für ein 5-20%iges lineares
Gradientengel**

Blot von : THO
Zellen

Blotlänge: 59

Lauflänge	MW	Protein	RF-Wert	%T	MW	LN T%	LN MW
7,5	200.000	Myosin	0,127	6,91	200.000	1,93	12,21
13,5	116.250	β -galactosidase	0,229	8,43	116.250	2,13	11,66
16,5	97.400	Phosphorylase B	0,280	9,19	97.400	2,22	11,49
21,5	66.200	bovine serum albumin	0,364	10,47	66.200	2,35	11,10
28,5	45.000	Ovalbumin	0,483	12,25	45.000	2,51	10,71
37,5	31.000	Carboanhydrase	0,636	14,53	31.000	2,68	10,34
45,0	21.500	Soyabean trypsin inhibitor	0,763	16,44	21.500	2,80	9,98
	14.400	Lysozyme					
	6.500	Aprotinin					



Molekulargewichtsberechnungen:					LN MW	MW
PLC	Lauflänge	RF-Wert	%T	LN %T	LN MW	MW
β 1	23,5	0,40	10,97	2,40	11,15	69.731
β 2	19	0,32	9,83	2,29	11,42	90.991
β 3	27	0,46	11,86	2,47	10,96	57.754
gamma 1	32	0,54	13,14	2,58	10,72	45.158
delta 2	32,5	0,55	13,26	2,58	10,69	44.119

Molekulargrößen der PLC-Isoformen zu Abb. 11a; THO-Zellen.

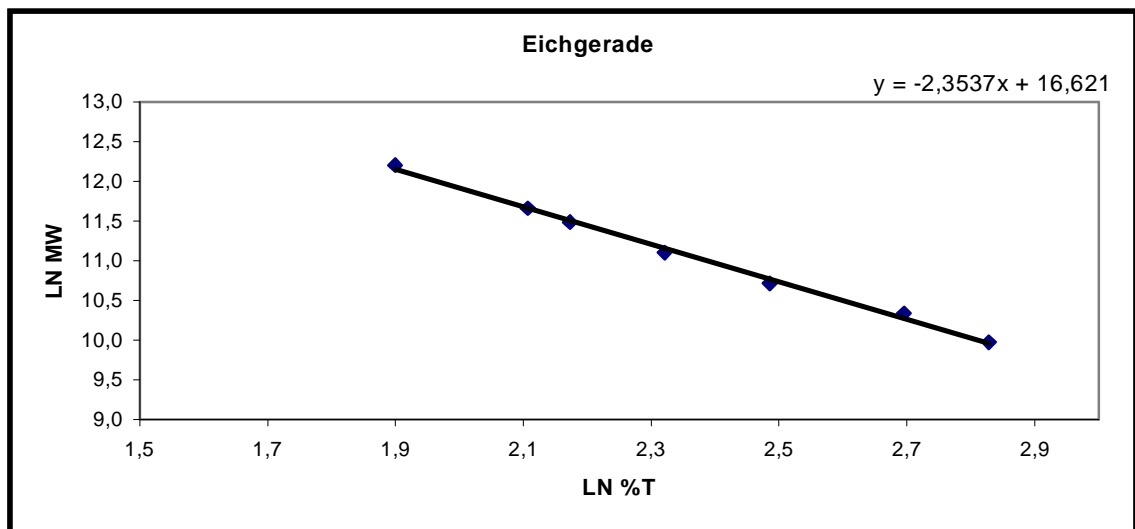
Molekülmassenberechnung der PLC

Isoformen durch Interpolation mit einer Eichgeradenfunktion für ein 5-20% Gel

Blot von : **MG 63 - Zellen**

Blotlänge: 53,5

Lauflänge	MW	Protein	RF-Wert	%T	MW	LN T%	LN MW
6,0	200.000	Myosin	0,112	6,68	200.000	1,90	12,21
11,5	116.250	β-galactosidase	0,215	8,22	116.250	2,11	11,66
13,5	97.400	Phosphorylase B	0,252	8,79	97.400	2,17	11,49
18,5	66.200	bovine serum albumin	0,346	10,19	66.200	2,32	11,10
25,0	45.000	Ovalbumin	0,467	12,01	45.000	2,49	10,71
35,0	31.000	Carboanhydrase	0,654	14,81	31.000	2,70	10,34
42,5	21.500	Soyabean trypsin inhibitor	0,794	16,92	21.500	2,83	9,98
47,5	14.400	Lysozyme	0,888	18,32	14.400	2,91	9,57
49,0	6.500	Aprotinin	0,916	18,74	6.500	2,93	8,78



Molekulargewichtsberechnungen:						
PLC	Lauflänge	RF-Wert	%T	LN %T	LN MW	MW
β1	21	0,39	10,89	2,39	11,00	59.946
β2	19	0,36	10,33	2,33	11,13	67.890
β3	23,5	0,44	11,59	2,45	10,85	51.759
gamma 1	28,5	0,53	12,99	2,56	10,59	39.560
delta 2	31	0,58	13,69	2,62	10,46	34.957

Molekulargrößen der PLC-Isoformen zu Abb. 11b; MG-63.

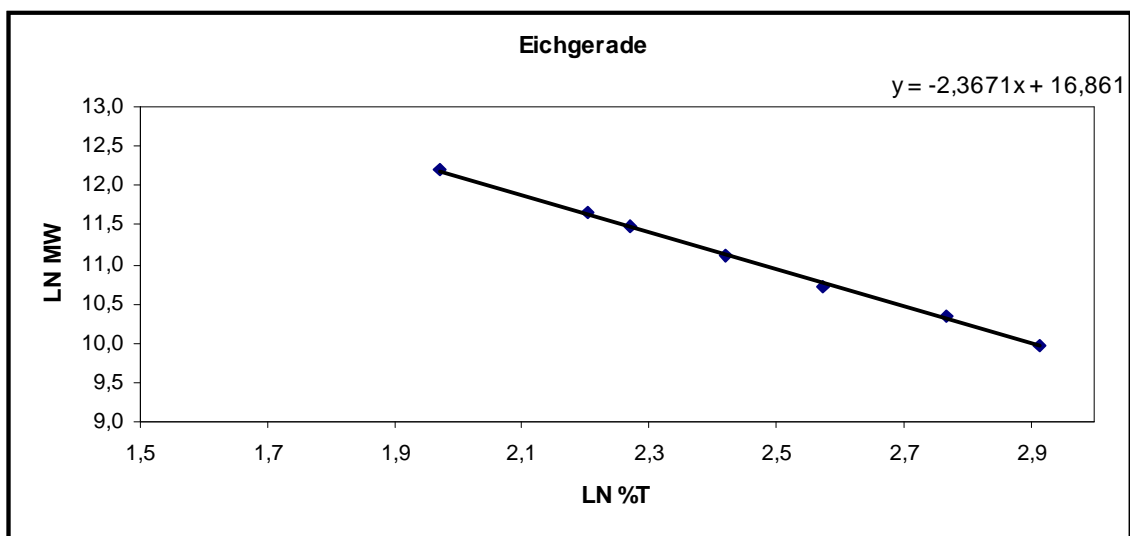
Molekülmassenberechnung der

**PLC-Isoformen durch Interpolation
mit einer Eichgeradenfunktion für
ein
5-20% Gel**

Blot von: POB's

Länge: 48

Lauflänge	MW	Protein	RF-Wert	%T	MW	LN T%	LN MW
7,0	200.000	Myosin	0,146	7,19	200.000	1,97	12,21
13,0	116.250	β -galactosidase	0,271	9,06	116.250	2,20	11,66
15,0	97.400	Phosphorylase B	0,313	9,69	97.400	2,27	11,49
20,0	66.200	bovine serum albumin	0,417	11,25	66.200	2,42	11,10
26,0	45.000	Ovalbumin	0,542	13,13	45.000	2,57	10,71
35,0	31.000	Carboanhydrase	0,729	15,94	31.000	2,77	10,34
43,0	21.500	Soyabean trypsin inhibitor	0,896	18,44	21.500	2,91	9,98
	14.400	Lysozyme			14.400		
	6.500	Aprotinin			6.500		



Molekulargewichtsberechnungen:					LN MW	MW
PLC	Lauflänge	RF-Wert	%T	LN %T	LN MW	MW
β 1	23	0,48	12,19	2,50	10,94	56.516
β 2	16	0,33	10,00	2,30	11,41	90.269
β 4	30	0,63	14,38	2,67	10,55	38.235
gamma 1	28	0,58	13,75	2,62	10,66	42.478
gamma 2	23,5	0,49	12,34	2,51	10,91	54.837

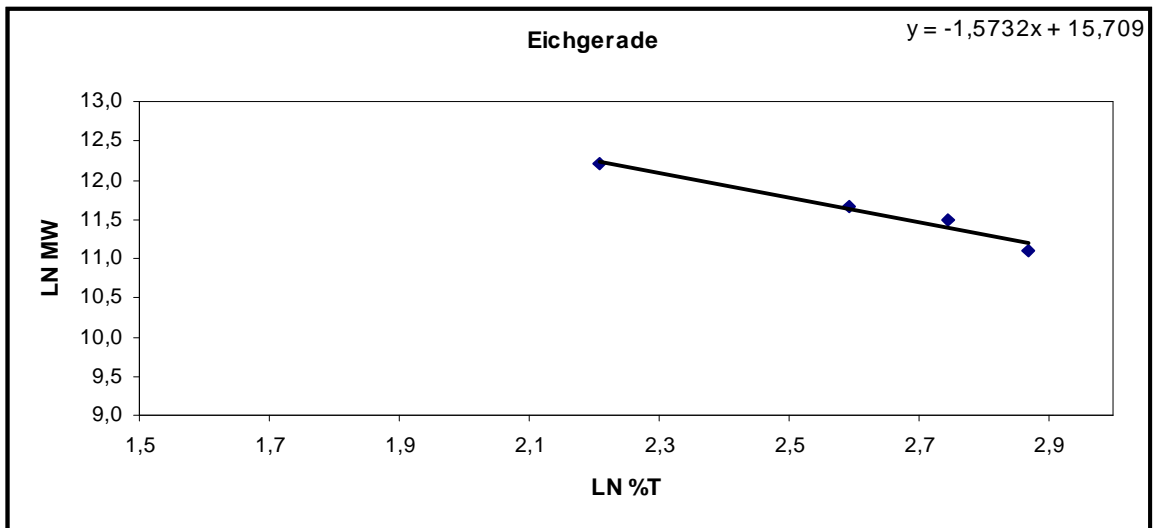
Molekulargrößen der PLC-Isoformen zu Abb. 12; POB.

Molekülmassenberechnung der PLC-Isoformen durch Interpolation mit einer Eichgeradenfunktion für ein 5-20% Gel

Blot von : SaOS-2
Zellen

Blotlänge: 44

Lauflänge	MW	Protein	RF-Wert	%T	MW	LN T%	LN MW
12,0	200.000	Myosin	0,273	9,09	200.000	2,21	12,21
24,5	116.250	β -galactosidase	0,557	13,35	116.250	2,59	11,66
31,0	97.400	Phosphorylase B	0,705	15,57	97.400	2,75	11,49
37,0	66.200	bovine serum albumin	0,841	17,61	66.200	2,87	11,10
	45.000	Ovalbumin			45.000		
	31.000	Carboanhydrase			31.000		
	21.500	Soyabean trypsin inhibitor			21.500		
	14.400	Lysozyme			14.400		
	6.500	Aprotinin			6.500		



Molekulargewichtsberechnungen:						
PLC	Lauflänge	RF-Wert	%T	LN %T	LN MW	MW
β 1	34	0,77	16,59	2,81	11,29	80.026
gamma 1	21,5	0,49	12,33	2,51	11,76	127.660
delta 2	34,5	0,78	16,76	2,82	11,27	78.750

Molekülgrößen der PLC-Isoformen zu Abb. 12a; SaOS-2.

Je nach verwendetem Lyse-Verfahren (Triton X-100, SDS) zur Proteingewinnung war ein Nachweis der Enzyme nur anhand von Fragmenten möglich, da die membrangebundenen Isoenzyme durch die chemische Aufschlüsselung an der Membran fragmentiert wurden. Dennoch bleibt die Aussagekraft hinsichtlich des PLC-Isoenzym-Expressionsusters in den Ergebnissen (Abb. 11, 11a, 12a, 12b) erhalten (LeMellay *et al.*, 1997).

Die Fragmentierung der PLC-Isoformen kann dabei durchaus variabel stattfinden, wie weitere Experimente ergaben (Ergebnisse Westernblots von M. Hoberg, Exp. Orthopädie & Biomechanik). So zeigen sich z. B. in Western-Analysen von PLC-beta-2 Fragmente von 50-110 kDa. Ebenso können leichte Kreuzreaktionen von PLC-gamma-1 Antikörpern mit PLC-gamma-2 Isoformen auftreten (Decker *et al.*, 1990).

Desweiteren erkennen spezifische monoklonale Antikörper vom Typ PLC-beta-1 Größen von 100 kDa und 41 kDa-Fragmenten (Suh *et. al.*, 1988).

Auch wurden in unserem Labor (M. Hoberg, Exp. Orthopädie & Biomechanik) Differenzen der Fragmentgrößen zwischen unterschiedlichen Osteosarkomzelllinien detektiert; z. B. zusätzliche Signale bei 67 kDa und 70 kDa in MNNG/HOS- und OST-Zellen, die in SaOS-2-Zellen nicht bzw. in MG-63-Zellen nur schwach nachzuweisen sind. Offensichtlich beeinflussen neben dem Lyseverfahren auch der Zelltyp und die verwendeten Antikörper die Fragmentierung der PLC-Isoformen.

3.6 Dokumentation der morphologischen Veränderungen in der THO-Zelllinie

Wir haben mehrmals versucht, die THO-Zellen über die 20. Passage hinaus zu kultivieren, aber mußten jeweils ab der 19. Passage feststellen, daß die Zellen sich in Ihren Wachstumseigenschaften und in Ihrer Morphologie veränderten. Der typische Osteoblast zeichnet sich durch bestimmte morphologische Hauptmerkmale aus. Hier gilt jedoch zu berücksichtigen, daß Zell- und Gewebekulturen keine homogenen Populationen liefern, da sich die Osteoblasten in verschiedenen Reife- und Entwicklungsstadien befinden. In der Zellkultur nehmen sie rasch eine sternförmige Gestalt an und bilden Kolonien vom Fibroblasten-Typ (Burkhardt R. et al., 1992). Im voll aktiven Zustand sind Osteoblasten kubisch oder polygonal geformt mit basophilem Zytoplasma, ihr Durchmesser beträgt 20-30 µm, sie besitzen zarte zytoplasmatische Fortsätze, ein gut unterscheidbares Zytozentrum und runde Kerne mit 1-3 großen Nukleolen. In der **Abb. 13** sind THO-Zellen der 15. Passage fotografiert worden. Man kann hier gut die vorhandene Homogenität der Zellen mit einem gleichmäßigen geordneten Wachstum erkennen. Die Zellen zeigen eine normale Größe und beschreiben osteoblastentypische Formen. Nach maximal 4 Tagen sind die Zellen gesplittet worden, da die Kulturflaschen konfluent waren.

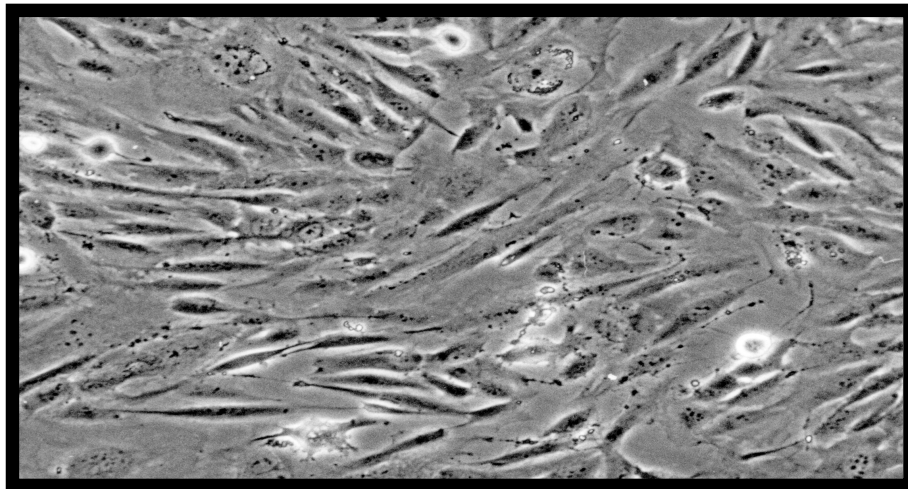


Abb. 13: THO-Zellen in der 15. Passage, fotografiert mit 10 X Objektiv.

Ab der 19./20. Passage hat sich das Wachstumsverhalten stark verändert, verbunden mit einer starken Reduktion der Proliferationsrate. Trotz mehrwöchiger Kultivierung konnte keine Konfluenz mehr erreicht werden, siehe **Abb. 14**. In diesem Stadium traten vermehrt Zellfragmentationen auf, welche sich im Medium anreicherten. Die Zellmorphologie änderte sich deutlich von einer polygonalen Form zu einer spindelförmigen Gestalt **Abb.15.(1)**. Einige Zellen zeigten einen Übergang zu einer eher osteozytischen Erscheinungsform mit dendritischen Ausläufern **Abb.15.(2)**.

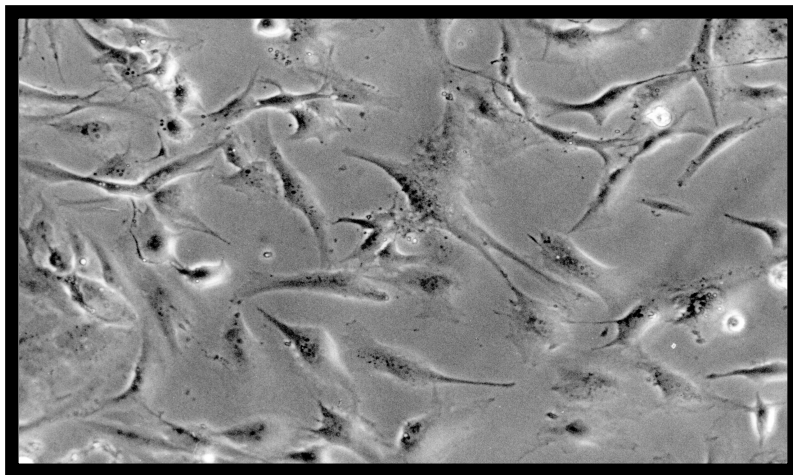


Abb. 14: THO-Zellen der 24. Passage, fotografiert mit 10 X Objektiv.

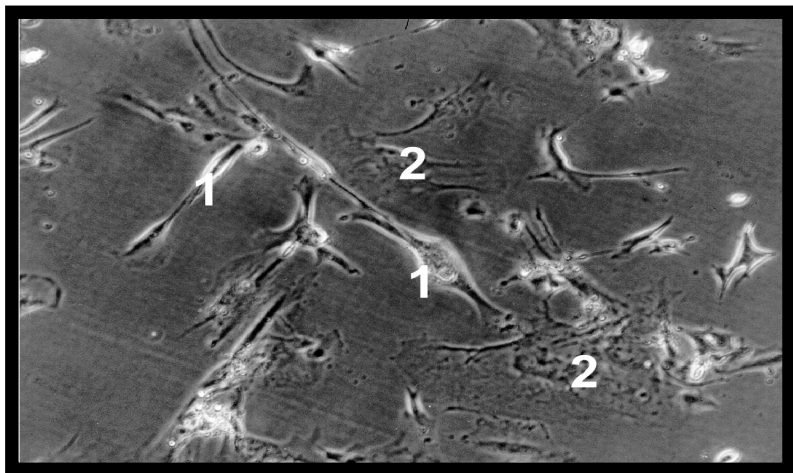


Abb. 15.1/2: THO-Zellen mit atypischer Morphologie, fotografiert mit 10 X Objektiv.
 (1): spindelförmige Gestalt
 (2): osteozytische Gestalt mit dendritischen Ausläufern

3.7 Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) Detektion als früher Apoptosemarker

Die in Abschnitt 3.6 beschriebenen Veränderungen der THO-Zellen nach einer bestimmten Anzahl von Teilungszyklen hat uns, nach einem durchgeführten und als negativ befundenen Mykoplasmentest dazu veranlaßt, diese Kultur hinsichtlich früher Apoptosezeichen zu untersuchen. Es ist ein bekanntes Problem von immortalisierten Zellen, daß sie in höheren Passagen oftmals einem Wachstumsarrest unterliegen. Hier sollte sich nun herausstellen, ob es sich nur um eine Verzögerung der Zellteilungsrate oder aber um einen apoptotischen Prozeß handelte.

Während des apoptotischen Prozesses verdichtet sich der Nukleus, es kommt zu einer Chromatinkondensation und zu einer Schrumpfung des Zellvolumens. Dieses typische Kennzeichen, die Fragmentierung der DNA durch endogene Nukleasen kommt an bestimmten Stellen vor, den internukleosomalen Linker-Regionen. Die so entstehenden Mono- und Oligonukleosomen reichern sich im Zytoplasma der apoptotischen Zelle an und können hier nachgewiesen werden. Weitere Veränderungen finden in der Zellmembran statt, wie z.B. die Translokation von Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen auf die Außenseite der Plasmamembran.

Da Proteasen ebenfalls in den Prozeß der Apoptose involviert sind, kann auch die nukleäre proteolytische Aktivität bestimmt werden. Das von uns verwendete DNA-bindende Protein PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) ist ein solches nukleäres Enzym, das bei DNA-Reparaturprozessen involviert ist und als Substrat für Apoptose-spezifische Proteasen der ICE (Interleukin 1 β Converting Enzyme)-Familie dient.

Die Spaltung von PARP durch die Protease Apopain gilt als früher Marker der Apoptose. Im Westernblot bei THO-Zellen der 16. Passage konnten wir die full length PARP (114 KD) sowie das große Spaltfragment (96 KD) detektieren **Abb. 16**. Das hier dargestellte Ergebnis zeigt einen eindeutigen Eintritt der Zelllinie in einen frühen apoptotischen Prozeß. Die genaue Größe der Banden auf der Membran konnte mit Hilfe eines Standards ermittelt werden **Abb. 17**.

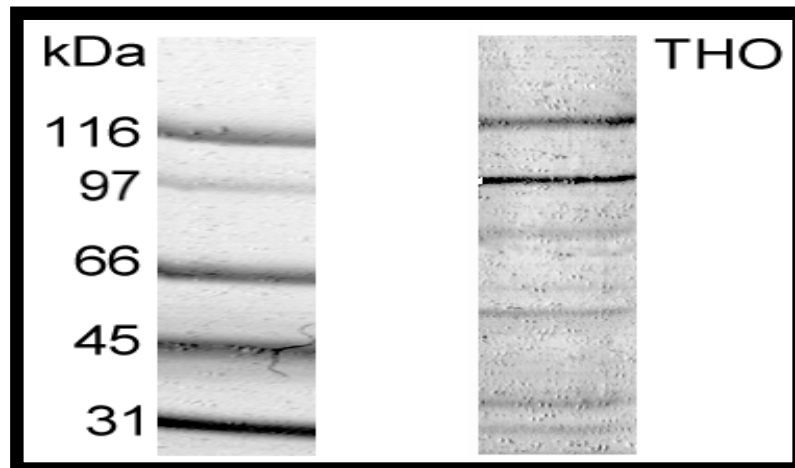


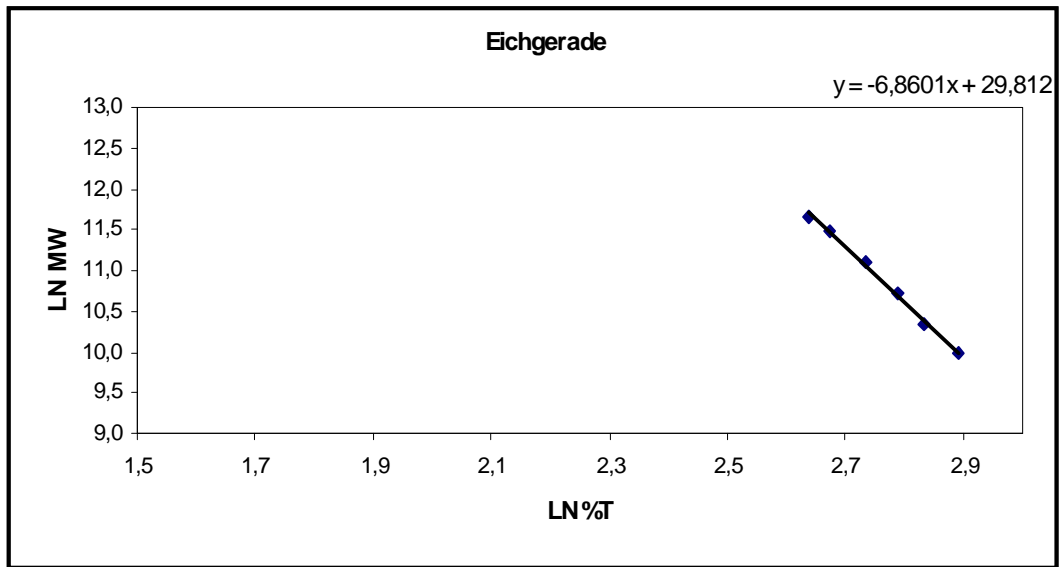
Abb. 16: Detektion von full length PARP (114 KD) und dem Spaltfragment (96 KD) im Westernblot als Zeichen eines frühen apoptotischen Prozesses.

Molekülmassenberechnung von PARP durch Interpolation mit einer Eichgeradenfunktion für ein 5-20% Gel

Blot von : THO
Zellen

Blotlänge: 60

Lauflänge	MW	Protein	RF-Wert	%T	MW	LN T%	LN MW
36,0	116.250	β-galactosidase	0,600	14,00	116.250	2,64	11,66
38,0	97.400	Phosphorylase B	0,633	14,50	97.400	2,67	11,49
41,5	66.200	bovine serum albumin	0,692	15,38	66.200	2,73	11,10
45,0	45.000	Ovalbumin	0,750	16,25	45.000	2,79	10,71
48,0	31.000	Carboanhydrase	0,800	17,00	31.000	2,83	10,34
52,0	21.500	Soyabean trypsin inhibitor	0,867	18,00	21.500	2,89	9,98
56,0	14.400	Lysozyme	0,933	19,00	14.400	2,94	9,57
57,0	6.500	Aprotinin	0,950	19,25	6.500	2,96	8,78



Molekulargewichtsberechnungen:						
PLC	Lauflänge	RF-Wert	%T	LN %T	LN MW	MW
PARP 1	36,5	0,61	14,13	2,65	11,65	114.328
PARP 2	38	0,63	14,50	2,67	11,47	95.518

Abb. 17: Molekülgrößenberechnung von PARP in THO-Zellen.

4. Diskussion

Die Erforschung von Knochenzellen und ihren Stoffwechselwegen in Bezug auf die Mechanotransduktion beruht zum größten Teil auf Erkenntnissen, die durch Experimente mit primären Osteoblasten nichthumanen Ursprungs gewonnen wurden. Ob man diese auch ohne weiteres auf menschliche Knochenzellen übertragen kann, ist fraglich. Die Kultivierung von primären Osteoblasten gestaltet sich schwierig, da man für bestimmte Versuche eine große Anzahl an Zellen benötigt und diese auch nicht ohne phänotypische Veränderungen über mehrere Passagen kultiviert werden können.

So haben unterschiedliche Präparationsverfahren verschiedene Vor- und Nachteile. Aus Ratten läßt sich nur wenig Knochenmaterial gewinnen und das auf Kosten einer hohen Mortifikation. Aus Rinderknochen hingegen gewinnt man viele Zellen (150×10^6 / Präp.), aber es arbeiten zur Zeit nur wenige Forscher mit Rinderzellen, da es schwierig ist, in Datenbanken geeignetes Material bovinen Ursprungs zu finden, obwohl Rinderzellen mit 95% eine große Homogenität zum humanen Genom aufweisen.

In unserem Labor sind bevorzugt bovine Zellen benutzt worden, da bedingt durch die große Homologie und die daraus resultierende Kreuzhybridisierung auch nicht bovine Antikörper verwendet werden können. Bei diesen primären bovinen Osteoblasten besteht zwar eine gewisse Inhomogenität, jedoch zeigen alle Zellen einer Präparation die gleichen Eigenschaften. Bei humanen Knochen besteht die Möglichkeit der Periost-Kultur nicht, hier wird das Spongiosa-Kulturverfahren angewandt. Diese Spongiosazellen zeigen beim Rind eine geringere Mechanosensitivität (Jones et al., 1991).

Aus soeben genannten Gründen besteht unser Interesse darin, eine Zelllinie mit immortalen Zellen zu etablieren. Der Hauptvorteil im Vergleich zu primären Zellen liegt in dem homogenen Phänotyp und einem einheitlichen Differenzierungsstadium der immortalisierten Zellen.

Ziel unserer Bemühungen war es, eine humane Osteoblastenzelllinie zu etablieren, die sich durch den Vorgang der Immortalisierung mit dem SV40 Genom über einen langen Zeitraum kultivieren läßt, ohne hierdurch phänotypische Veränderungen zu erfahren. Erstrebenswert ist eine homogene Zelllinie, um in den zeitaufwendigen Experimenten vergleichbare Ergebnisse erzielen zu können, die sich mehrfach reproduzieren lassen.

Die rekombinante DNA-Technologie hat Wege gefunden, heterologe DNA nicht nur in Bakterienzellen, sondern auch umgekehrt in eukaryotische Zellen zu übertragen. Für die Einführung von DNA in höhere Zellen stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Diese reichen von der Verwendung von Viren bzw. Viruspartikeln (Elder et al., 1981) über Fusionen von künstlichen oder natürlichen Zellmembranbestandteilen, im Sinne eines Liposomentransfers bis hin zur direkten Mikro-Injektion von Genen (Capecchi et al., 1980).

Voraussetzung für die Anwendung dieser Techniken sind geeignete Selektionsverfahren, um damit die transformierten Zellen, die die rekombinante DNA aufgenommen haben, anreichern zu können. Die Anwendungsmöglichkeiten für Antibiotika sind bei eukaryotischen Zellen auf wenige hochtoxische Produkte beschränkt. So verhält es sich auch bei dem von uns verwendeten Aminoglykosid G418 (Geneticin), gegen das Hefezellen, aber auch Mäuse-, Affen- und menschliche Zellen empfindlich sind.

Eine erfolgreiche Übertragung und Expression verleiht den Zellen Antibiotikaresistenz, auf die als dominanter, stabiler Marker leicht selektioniert werden kann (Colbere-Garapin et al., 1981). So haben auch wir mit der G418-Resistenz sehr gute Selektionierungsergebnisse erreichen können.

Welche Charakteristika haben nun unsere mit dem SV40 Virus immortalisierten Zellen (THO) in den verschiedenen Experimenten im Vergleich zu anderen Zellen, wie primäre bovine Osteoblasten (POB), humane Osteosarkomazellen (MG-63, SaOS-2, HOS-MNNG, U-2 OS) und Rattenosteosarkomazellen (ROS-17/2.8) gezeigt und was haben diese Ergebnisse für eine Auswirkung auf in Zukunft geplante Projekte?

Primäre bovine Osteoblasten synthetisieren bestimmte Proteine, und da sie *in vitro* morphologisch nicht sicher zu unterscheiden sind, werden sie indirekt anhand ihrer typischen Produkte und Merkmale identifiziert. Diese werden über eine Aktivierung des PTH-Rezeptors nach Stimulierung und durch die Synthese von BSP I = Osteopontin, BSP II, Alkalische Phosphatase, Osteokalzin, Kollagen I und Kollagen III (wobei bei den Kollagenen ein Überwiegen der Typ I Form vorliegen sollte) bestimmt. Wie in Vorversuchen ermittelt, werden alle diese Strukturproteine bzw. nichtkollagenen extrazellulären Matrixproteine von primären bovinen Osteoblasten exprimiert, welche uns bei unseren Experimenten als Kontrollzellen dienten, da die immortalisierten humanen Osteoblasten (THO-Zellen) die gleichen Attribute besitzen sollten.

Wir haben nun mit immunzytochemischen Antikörpertests das Synthesemuster der Matrixproteine in THO-Zellen bestimmen können. Es zeigte sich, daß die Transfektion mit dem SV40 großen T-Onkogen die Proliferation der Zellen induziert, ohne daß es zu einem Verlust von Kollagen I, Kollagen III, BSP I, Alkalischer Phosphatase und Osteokalzin kommt. Wir konnten mit dieser Methode kein Überwiegen der Kollagen I Form gegenüber der Kollagen III Form nachweisen.

Weiterhin war eine Bestimmung der PTH Rezeptorfunktion durch Bildanalyse nicht möglich, da die apoptotischen THO-Zellen aufgrund zu niedriger Esteraseaktivität nicht in der Lage waren, den mit Ca^{2+} - bindenden Fluoreszenzfarbstoff (FURA 2 AM) aufzunehmen. Die THO-Zellen zeigen lediglich eine geringere Präsenz von BSP II, im Vergleich zu primären bovinen Osteoblasten, bei sonst identischem Expressionsmuster der verschiedenen Proteine.

BSP II wird sowohl von Osteoblasten als auch von Osteosarkomazellen sezerniert (Oldberg A. et al.) und eine verminderte Expression könnte mit einer geringeren Adhäsionsfähigkeit und/oder mit einer verminderten chemotaktischen Wirkung einhergehen (vgl. Kap. 1.1). Tatsächlich konnten wir während der Kultivierung eine vermehrte Ablösungsbereitschaft der Zellen vom Substrat beobachten, wobei die frei flottierenden Zellen vital waren, was durch einen Trypanblaufärbetest bestätigt wurde. Auch eine Beschichtung des Substrates mit Gelatine führte nicht zu einer Verbesserung des Adhäsionsverhaltens der THO-Zellen. Es stehen nun zwei Möglichkeiten als Gründe für eine verminderte Adhäsionsfähigkeit zur Diskussion. Zum einen könnte die verminderte Expression von BSP II verantwortlich sein, da dieses Protein für eine gute Haftung der Zellen an Oberflächen essentiell ist, zum anderen kann der im Ergebnisteil beschriebene Eintritt in den programmierten Zelltod der Grund für eine Veränderung im Wachstumsverhalten sein.

In den anschließend durchgeführten Dehnungsversuchen fanden wir weitere osteoblastentypische Charakteristika der THO-Zelllinie. Wie schon an der Universität in Münster durch die Forschungsgruppe um Prof. D.B. Jones ermittelt, zeigen primäre bovine Osteoblastenkulturen ein bestimmtes Reaktionsmuster auf mechanische Belastungen. Hierbei kommt es bei einer physiologischen Belastung im Bereich von $3000\mu\text{str.}$ zu einem deutlichen, mit 27% gemessenen Anstieg der Wachstumskurve, welche Ausdruck der Proliferationsrate der Zellen ist.

Bei einer humanen Osteosarkomazelllinie (MG-63) konnte ein Proliferationszuwachs von mehr als 30% gemessen werden. Hingegen zeigte die Wachstumskurve bei einer mechanischen Stimulation im hyperphysiologischen Bereich (5000 μ str.) eine deutlich absteigende Tendenz. Die THO-Zellen haben nahezu identische Ergebnisse aufweisen können, mit einer Wachstumszunahme von 30% bei physiologischer Belastung. Im hyperphysiologischen Bereich zeigte sich eine Stagnation der Wachstumskurven und in ein paar Fällen sogar eine leichte Verminderung.

Interessant ist dieses Ergebnis unter dem Aspekt, daß mehrere von uns getestete Tumorzelllinien nach dem dritten Belastungstag im physiologischen Bereich eine starke Abnahme des Proliferationsverhaltens zeigten, bzw. ein Stagnieren der Wachstumskurve. Im einzelnen sahen die Meßergebnisse wie folgt aus:

SaOS-2 Zellen:	Abnahme von 30%
HOS-MNNG Zellen:	Abnahme von 35%
U-2 OS Zellen:	Abnahme von 40%
ROS-17/2.8 Zellen:	Stagnieren des Wachstums

Es ist ein willkommenes Ergebnis, daß unsere THO-Zellen trotz der durchgeführten Immortalisierung noch die mechano-sensiblen Fähigkeiten eines primären Osteoblasten in sich vereinigen und nicht die Eigenschaften der Tumorzelllinien, wie SaOS-2, HOS-MNNG, U-2 OS, und ROS-17/2.8 besitzen. Desweiteren besteht eine sehr große Ähnlichkeit im Reaktionsverhalten der MG-63-Zellen und der THO-Zellkultur. Diese beiden Zelllinien reagieren auf mechanische Belastungen mit einem gleich großen Zuwachs der Proliferationsrate und zeigen ein identisches PLC-Expressionsmuster, welches im folgenden noch diskutiert wird.

Dennoch sind die MG-63 Zellen keine geeignete Zelllinie für weitere Untersuchungen bezüglich der Mechanotransduktion, da sie nicht kontaktinhibiert sind und nach Dehnung keine Kalziumantwort gemessen werden konnte (Tenbosch et al., eingereicht). Diese Ergebnisse zeigen sehr unterschiedliche Reaktionen der verschiedenen Zellen auf die Applikation von mechanischen Kräften. Wie stark sollten diese Belastungen sein und wie konnten diese Größenverhältnisse ermittelt werden?

So sind in der Vergangenheit verschiedene Kraftgrößen bestimmt worden. Bei *in vivo* Messungen mit Applikationen von Dehnungsmeßstreifen auf den Knochen wurde durch Lanyon et al., 1975 eine physiologische Größenordnung von 850 μ strain gemessen, wohingegen Burr et al., 1995 den Bereich der physiologischen Größenordnung mit 2000 μ strain angaben. Einen weiteren Wert konnte Jones et al., 1991 erstmals bei *in vitro* Messungen bestimmen, bei denen er den Bereich der minimal notwendigen Kraft, um eine positive Proliferationsrate zu erhalten (physiologische Belastung) mit 3000 μ strain angab.

Daraus folgt, daß ein ausreichendes Maß an Belastung für den Organismus unabdingbar ist, trotz der Vermutung, daß die *in vitro* gemessenen Belastungsgrößen nicht die physiologischen *in vivo* Konditionen widerspiegeln (Smith et al., 1996). So kommt es bei Astronauten oder auch bei immobilisierten Patienten zu einer Atrophie der Knochenmasse. Um also z.B. bei Frauen im höheren Alter die hormonbedingte Abnahme der Knochenmasse zu reduzieren, bieten sich körperliche Trainingsprogramme an (Smith et al., 1986). So konnte bei Studien eine Zunahme des Mineralgehaltes des Knochens von 2,29% im Vergleich zu der nicht aktiven Kontrollgruppe gemessen werden (Smith et al., 1981).

Wie bereits kurz erwähnt, gehörte die Bestimmung der PLC-Isoenzymmuster in den Rahmen der Charakterisierung der THO-Zellen und wurde durch die Analyse der Verteilungsmuster in POB's, MG-63 und SaOS-2-Zellen ergänzt. So konnten wir eine Reihe von wichtigen und noch nicht bekannten Daten gewinnen, zu denen es in der bisherigen Literatur noch keine Informationen gibt. Wie in der Einleitung bereits ausführlich beschrieben, katalysiert die Phospholipase C (PLC) den hydrolytischen Schritt von Phosphatidyl- Inositol- 4,5 Bisphosphat (PIP₂) zu den für die weitere Signalkaskade essentiellen second messengern Inositol- 1,4,5 Triphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) (Alberts et al., 1996).

Da Jones et al., (1991) bereits den Anstieg in der Ca²⁺ -Konzentration nach mechanischer Belastung mit der PLC-Aktivierung in Verbindung gebracht haben, lag es nahe, die THO-Zellen und ihr exprimiertes Isoenzymmuster mit anderen mechanosensiblen und nicht-mechanosensiblen Zellen zu vergleichen, um der Frage nachzugehen, ob eine bereits bekannte PLC Isoform an der Mechanotransduktion beteiligt ist oder ob es vielleicht sogar eine bisher noch nicht entdeckte PLC_{mec.} gibt. Zu den Zellen, die mit einer Steigerung der Proliferationsrate auf mechanische Belastungen reagieren, gehören wie oben schon beschrieben die POB's, MG-63-Zellen und auch unsere THO-Zellen. Hingegen reagierten die SaOS-2-Zellen mit einem deutlichen Rückgang der Wachstumsrate.

	<i>beta 1</i>	<i>beta 2</i>	<i>beta 3</i>	<i>beta 4</i>	<i>gamma 1</i>	<i>gamma 2</i>	<i>delta 1</i>	<i>delta 2</i>
POB's	X	X		X	X	X		
THO	X	X	X		X			X
MG-63	X	X	X		X			X
SaOS-2	X				X			X

Abb.1: PLC-Isoform-Expressionsmuster der Zelllinien im Vergleich.

Betrachtet man sich nun die unterschiedliche Verteilung der PLC-Isoformen, so fällt auf, daß zum einen bei POB's die beta 4 anstelle der beta 3- Form vorliegt, einhergehend mit einer Expression von gamma 2 statt delta 2 im Vergleich zu den immortalisierten THO-Zellen und der humanen Osteosarkomzelllinie MG-63. Bisher bekannt ist eine beta 4 Isoform, die über einen Glutamatrezeptor Funktionen im Kleinhirn steuert und bei Ihrer Abwesenheit wurden bei Mäusen Ataxieanfälle beobachtet. Die Versuchstiere fielen durch motorische Defekte auf, indem sie hypokinetisch waren und einen watschelnden Gang hatten. Die Ataxie kam nicht durch Malformationen der Knochenstruktur zustande, was darauf hinweist, daß die beta 4 Isoform nicht essentiell für die Signalkaskade des Knochenstoffwechsels ist. Durch Röntgenaufnahmen wurde ein regulärer Knochenaufbau bestätigt (Kim et al., 1997).

Desweiteren könnte die Hypothese aufgestellt werden, daß delta 2 eine Isoform darstellt, die bevorzugt in tumorartigen Zellen (THO, MG-63, SaOS-2) vorkommt und somit ihr Fehlen in einer primären Kultur erklären. Zu untermauern ist diese Aussage durch das Vorhandensein einer delta-Form bei weiteren Tumorzelllinien. So wurde bei einer Rattenpheochromozytomlinie (PC12) eine PLC-delta 1 Isoform nachgewiesen (Zini et al., 1994). Weiterhin ist die PLC-Isoform delta 1 von einer Reihe humaner Kolonkarzinomzelllinien (HCT 116, Fet, SW 480, SW 620, SW 1417, HT 29, LS 174T, SKCO 1) exprimiert worden, wohingegen sie aber auch von normalen Mukosazellen exprimiert wurde (Nomoto et al., 1995), was wiederum gegen diese Hypothese spricht.

Noch interessanter und vielleicht richtungsweisend ist das Vorhandensein der beta 2-Form bei allen drei mechanosensiblen Zelllinien (POB's, THO und MG-63) und die Abwesenheit dieser Isoform bei nicht-mechanosensiblen Zellen (SaOS-2). Man könnte hier vermuten, daß die Anwesenheit von beta 2 bei der Signalkaskade in der Mechanotransduktion eine wichtige Rolle spielt.

Es gibt eine Reihe von Denksätzen bezüglich der Verteilungsmuster der einzelnen PLC-Isoformen und somit auch über die Vorstellung ihres Wirkungsspektrums. Erst weitere Bemühungen, die mit Sicherheit Gegenstand zukünftiger Forschung sein werden, decken mehr Details über den Einfluß der Phospholipase C in der Signaltransduktion in mechanosensiblen Knochenzellen auf.

Die THO-Zellen schienen zunächst alle Erwartungen an eine immortalisierte und phänotypisch nicht veränderte, osteoblastentypische Kultur zu erfüllen. Leider müssen wir aufgrund der später gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf die morphologischen Veränderungen und den Eintritt der Zellen in den programmierten Zelltod, die Methode der Immortalisierung neu überdenken und in einem erneuten Versuch bestimmte, bisher noch nicht berücksichtigte Faktoren mit einbeziehen.

Zur Immortalisierung stehen zur Zeit eine Reihe von Genen zur Verfügung, neben dem von uns verwendeten großen T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) noch folgende: Papillomavirus E6 und E7, Adenovirus E1A, Epstein-Barr Virus, humanes T-Zell Leukämie Virus, Saimiri Herpesvirus, Onkogene und Mutanten des p53 Genes (Katakura et al., 1998). In humanen Zellen führt eine Infektion mit SV40 zu einer Integration der viralen DNA in die Wirtszelle (Hara und Kaji, 1987). Das für die Immortalisierung verantwortliche T-Antigen stimuliert die zelluläre DNA-Synthese, welche jedoch bei unseren THO-Zellen nach der 20. Passage zum Stillstand kam.

Es konnten schon einige Nagetierzellen erfolgreich mit dem SV40 T-Antigen immortalisiert werden (Chou, 1989; Chang, 1986; Christian et al., 1987; Harris, 1987; Reddel et al., 1988). Trotzdem war es bisher nicht möglich, alleine durch SV40 T-Antigen humane Fibroblasten zu immortalisieren.

Mit SV40 transfizierte humane Fibroblasten haben eine verlängerte Lebensdauer, bedingt durch herabgesetzte Anforderungen an Wachstumsfaktoren, aber schließlich erreichen auch diese Zellen einen kritischen Punkt, verbunden mit einem Wachstumsarrest, der mit dem Tod der Zellen endet. Hier gibt es nur eine sehr kleine Anzahl von Zellen, die aus nicht bekannten Gründen der Krise entkommen und eine Zelllinie bilden können (Huschtscha et al., 1983).

Mit einer temperatursensitiven Mutante des SV40 T-Antigens (tsA58) hingegen, konnte McKay (1988) eine erfolgreiche Immortalisierung bei Vorläuferzellen des Zentralen Nervensystems durchführen und mit der gleichen temperatursensitiven Mutante inklusive dem Gen für eine G418-Resistenz konnte 1995 durch Harris et al., eine humane fetale Osteoblastenzelllinie (hFOB) immortalisiert werden. Die neueste Immortalisierung mit dieser temperatursensitiven Mutante stammt aus 1998, hier haben Hicok et al., Osteoblastenprecursorzellen des menschlichen Knochenmarks mit dem pZipSV40tsA58 Vektor immortalisiert.

Im allgemeinen bewahren die *in vitro* mit dem SV40 T-Antigen immortalisierten Zellen ihren Phänotyp, bleiben kontaktinhibiert (Frisa et al., 1994; Goodman et al., 1993) und sind so nur selten in der Lage, Tumoren *in vivo* zu bilden, nachdem sie in Nacktmäuse injiziert wurden (Jat and Sharp, 1986). Trotzdem führt das SV40 T-Antigen zu einer beträchtlichen Steigerung der Wachstumsraten in transformierten Zellen. Dieses schnellere Wachstum wird mit einer größeren Durchlaufrate in der G1-Phase erklärt (Sladek und Jacobberger, 1992). Diese Eigenschaften werden auf die Interaktion mit zwei zellulären Proteinen, dem Retinoblastengenprodukt RbE2F (partizipiert an der Transkription der Gene in der G1/S Phase des Zellzyklus und dem p53 (Tumorsuppressorgen) zurückgeführt (Nevins et al., 1992).

Chang und Schlegel (1996) zeigten, daß durch SV40 Antigen ansteigende Proteinlevel entfaltet werden konnten, verbunden mit einer enzymatischen Aktivität von Cyclin A, Cyclin B und p34^{cdc25} vor der Immortalisierung, was darauf hinweist, daß veränderte Mitosekontrollen eine direkte Konsequenz auf die T-Antigen Expression haben. Ein anderer wichtiger Punkt ist die gefundene Mutation eines Gens auf Chromosom 6 (SEN6/6q26-27) bei dem durch SV40 vermittelten Immortalisierungsprozeß (Banga et al., 1997). Humane Tumore, wie das Non-Hodgkin-Lymphom, Mammakarzinom und Ovarialkarzinom haben einen Verlust der Heterozygotität im 6q26-27 Bereich gezeigt. So könnte die Inaktivierung von SEN6 für die Immortalisierung der Tumore verantwortlich sein.

Die daraus folgende Überlegung war, daß der Verlust eines Genes auf Chromosom 6, ohne gleichzeitige Veränderungen von p53, zu einer Verlängerung der Lebensspanne der Zellen führt, ohne sie jedoch zu immortalisieren (Tsutsui et al., 1997). P53 wird normalerweise in der ersten Phase der Immortalisierung blockiert, da es die normale Zelle in seiner Funktion als Tumorsuppressor davor schützt, sich in eine Tumorzelle zu verwandeln. Entweder inhibiert es die Zellteilung solange, bis die geschädigte DNA repariert ist oder es veranlaßt die Zelle, durch Einleitung eines apoptotischen Prozesses dazu, sich selbst zu vernichten (Dickman et al., 1997).

Der dennoch stattgefundene Wachstumsarrest bei den THO-Zellen könnte durch das erst vor kurzem beschriebenes Protein „p73“ verursacht worden sein. Dieses dem p53 sehr ähnliche Protein scheint auch seine wachstumsinhibierenden und apoptosefördernden Effekte gleichermaßen zu besitzen. Da p73 an einer Stelle auf Chromosom 1 lokalisiert ist, die bei vielen Krebserkrankungen eine Deletion aufweist, wird angenommen, daß es ebenfalls ein Tumorsuppressorgen ist (Versteeg et al., 1995).

Zur erfolgreichen Immortalisierung einer Zelllinie müssen diese Tumorsuppressorgene blockiert werden, damit es nicht durch Freisetzung von Sauerstoffradikalen an der mitochondrialen Membran zu einem Lösen der Sicherungsverbindung zwischen dem anti-apoptotischen Bcl-2 und den apoptosefördernden Faktoren Bax/ced-4/AIF kommt (Wyllie et al., 1997). Nun stellt sich die Frage, warum Immortalisierungen bei bestimmten Nagetierzellen im Vergleich zu humanen Zellen erfolgreich waren. Das ist darauf zurückzuführen, daß die Transaktivierung von p53 bei der Apoptose nicht in allen Zelltypen involviert ist (Caelles et al., 1994).

So konnte die 1996 von Ghosh-Choudhury et al. immortalisierte Zelllinie (Osteoblasten vom Schädelknochen einer p53 null-Maus) zwar osteoblastentypische Merkmale aufweisen, aber auch nur in einem begrenzten Zeitraum von 30 Zellteilungen, bei denen es zu keiner Veränderung in der Morphologie kam. Das neuste Modell der Immortalisierung stellt das Immunoselektionsverfahren mit dem STRO-1-Antikörper dar. Hier wurden fetale menschliche Knochenmarkszellen von den nicht-adhärenenten fetalen humanen Knochenmarkstromazellen durch den Antikörper STRO-1 selektiert und dann mit dem SV-40 T-Antigen immortalisiert. Der so entstandene Klon (F/STRO-1+A) zeigte ein rasches, aber nicht tumorartiges Wachstum, mit einer Expression von Alkalischer Phosphatase, BSP I (Osteopontin), und Prokollagen I. Nicht detektiert werden konnten die Marker der späten Osteoblastendifferenzierung wie Osteokalzin und BSP II (Oyajobi et al., 1999).

Zu überdenken wäre eine erneute Immortalisierung der THO-Zellen mit einem anderen Genkonstrukt. Mit dem humanen Papillomavirus (HPV) und seinen beiden Proteinen E6 und E7 konnten bei unterschiedlichen Zellen wie Keratinozyten (Munger et al., 1989; Hawley-Nelson et al., 1989), humanen Pankreasgangepithelzellen (Furukawa et al., 1996) und vielen anderen Epithelzellen (Oda et al., 1996) gute Ergebnisse erreicht werden.

Die hierbei erzielte Immortalisierungsrate war höher als bei Immortalisierungen mit dem SV40 Antigen. Das E7 Gen konnte unabhängig, wenn auch mit einer niedrigeren Rate als gemeinsam mit dem E6 Gen, humane Keratinozyten immortalisieren (Halbert et al., 1991). Zusätzlich demonstrierten Stoppler et al., 1996, daß das HPV Typ 16E5 Gen die Effektivität der Immortalisierung mit E6/E7 steigern kann.

Die immortalisierende Aktivität von E6 liegt wahrscheinlich in der Inaktivierung von p53 (Scheffner et al., 1990; Sedman et al., 1992). Das E7 Gen scheint die Fähigkeit zu besitzen, sich an Rb zu binden (Dyson et al., 1989) und so den Retinoblastengenprodukt-Komplex (E2F-Rb) zu trennen. 1996 zeigten Reznikoff et al. eine Möglichkeit, daß Zellen immortalisiert werden können, zum einen durch die Inaktivierung von Rb in transformierten E7 Zellen und zum anderen durch die Inaktivierung von p16, einem Cyklin abhängigen Kinaseinhibitor, in transformierten E6 Zellen.

An dieser Stelle sei noch kurz auf ein zur Zeit sehr aktuelles Thema hingewiesen. Die Telomeraseaktivität, die momentan durch die intensiv betriebene Altersforschung bzw. bei der Aufklärung des Alterns unseres Organismus und der damit verbundenen Stoffwechselvorgänge von besonderem Interesse ist, wurde bei über 85% der humanen Krebserkrankungen gefunden. Sie elongiert die Telomere und könnte für das Tumorwachstum bei Immortalisierungsprozessen erforderlich sein.

Eine von Dhaene et al., 1998 durchgeführte Untersuchung über die Anwesenheit der Telomerase in malignen Pleuramesotheliomen ergab, daß 20 von insgesamt 22 untersuchten Mesotheliomen (91%) und alle von diesen Tumoren abgeleiteten Zelllinien, telomerasepositiv waren. Diese Ergebnisse stimmen mit der Hypothese überein, daß die Telomeraseaktivität ein wesentliches Charakteristikum der Karzinogenese auch in anderen Tumoren sein könnte.

Diese Ergebnisse sind nicht nur bezüglich neuer Immortalisierungsverfahren interessant, sondern könnten auch klinisch in Bezug auf Anti-Telomerase-Medikamente nützlich sein. Die Aktivierung der Telomerase, einem Ribonukleoproteinkomplex, durch den sich wiederholende Telomersequenzen am Chromosomende synthetisiert werden, um den fortschreitenden Verlust der Telomere während der Zellteilung auszugleichen, wird wie oben bereits erwähnt in Zusammenhang mit der Zellimmortalisierung gebracht (Katakura et al., 1998).

Hier konnten Klingelhutz et al., 1996 demonstrieren, daß die Telomeraseaktivierung und eine durch E6 vermittelte Abnahme der p53 Aktivität nicht ausreichend sind für eine Zellimmortalisierung und daß die Telomerasetätigkeit einen wesentlichen aber ungenügenden Bestandteil der Transformierung durch HPV darstellt. Hierzu gibt es neuere Untersuchungen, die diese Ergebnisse unterstreichen und um einen wesentlichen und interessanten Aspekt erweitern. Kiyono et al., (1998) konnten zeigen, daß weder die Aktivierung der Expression der katalytischen Komponente der Telomerase (hTERT), noch die durch E6 induzierte Telomeraseaktivität zu einer Immortalisierung führen. Wohingegen die durch E7 induzierte Inaktivierung von Rb/p16 bzw. die verminderte Expression von p16, in Kombination mit der Telomeraseaktivität in der Lage ist, Epithelzellen zu immortalisieren. Sie schlußfolgern, daß die Eliminierung von p53 für die Immortalisierung nicht notwendig ist.

Auf der Suche nach weiteren Immortalisierungsverfahren trifft man unter anderem auf das Adenovirus E1A Protein, welches in der Lage ist Zellkulturen zu immortalisieren. Es konnte durch einige Studien gezeigt werden, daß die mit E1A durchgeführte Zellimmortalisierung vermittelt wird über die Inhibierung von Rb und daß desweiteren eine Reihe von Genprodukten über den E2F abhängigen Übertragungsweg aktiviert werden (Katakura et al., 1998).

Es scheinen weitere hiervon unabhängige Signalwege zu existieren, über die andere zelluläre Regulationsproteine, wie c-fos (Sassone-Corsi & Borrelli, 1987) und hsp70 (Simon et al., 1987) involviert sind. Anscheinend werden diese Proteine zum Schutz der Zelle freigesetzt, vielleicht auch veranlaßt durch den Immortalisierungsprozeß. Bei von uns durchgeführten Experimenten auf Parabellflügen sollten die Auswirkungen von Schwerelosigkeit auf Osteoblasten untersucht werden. Dabei zeigte sich ein Artefakt, nämlich die sehr wahrscheinlich durch Vibrationen oder Druckunterschiede verursachte Expression von hsp70B' (Tenbosch et al., eingereicht).

Ein auch zur Immortalisierung der Zielzellen führender Prozeß ist der DNA vermittelte Gentransfer von verschiedenen Onkogenen. So konnten embryonale Rattenfibroblasten mit dem c-myc Onkogen (Ruley et al., 1983; Mougneau et al., 1984) und neuronale Precursorzellen des olfaktorischen Epithels mit dem n-myc Onkogen (MacDonald et al., 1996) immortalisiert werden. Wie dem auch sei, eine Immortalisierung von humanen Zellen durch zelluläre Onkogene ist schwierig.

Der von unserem Team durchgeführte Versuch der Immortalisierung einer humanen primären Osteoblastenkultur mit dem SV40 Virus und die Charakterisierung der daraus resultierenden THO-Zellen konnte die gesteckten Ziele bezüglich der Etablierung einer immortalisierten humanen Osteoblastenzelllinie nicht erfüllen, da die Zellen in die Apoptose übergingen. Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit geben aber viele neue, interessante Denkanstöße für die weitere Forschung in diesem Bereich.

So sind die THO-Zellen zum einen in der Lage, bestimmte osteoblastentypische Marker (Prokollagen Typ I und III, BSP I = Osteopontin, Alkalische Phosphatase, Osteokalzin und in geringen Mengen BSP II) zu exprimieren. Zudem zeigten sie noch eine mit primären bovinen Osteoblasten durchaus gleichzusetzende Zunahme der Proliferationsrate (+30%) nach mechanischer Belastung, wohingegen die humane Osteosarkomazelllinie (SaOS-2, die p53 und Rb/E2F inhibiert ist) eine deutliche Abnahme der Proliferationsrate (-30%) nach mechanischer Belastung zeigte. Das PLC-Isoenzymmuster der THO Zellen gleicht dem der MG-63 Zellen, es konnten beta1, beta2, beta3, gamma1 und delta2 detektiert werden. Die bei den mechanosensiblen Zelllinien (POB's, MG-63 und THO) vorkommende beta2 Isoform konnte bei den nicht dehnungssensitiven SaOS-2 Zellen nicht gefunden werden.

Andererseits ist es uns nicht möglich, die THO-Zellen über die 26. Passage hinaus zu kultivieren, da bereits in der 16. Passage frühe Zeichen der Apoptose durch den PARP-Antikörper detektiert werden konnten. Somit eignen sich die Zellen nur eingeschränkt und in sehr frühen Passagen zu Experimenten, was sie nicht zu einem geeigneten Modell für die Untersuchung von intrazellulären Stoffwechselwegen in der Mechanotransduktion macht. Bezüglich der verschiedenen Immortalisierungsverfahren gibt es viele Ansatzmöglichkeiten, aber es sind nach wie vor nur einzelne Teile eines Puzzles und es werden immer neue Teile der Erkenntnis hinzukommen und nur so kann sich langsam ein Gesamtbild formen. Auch unser Team wird weiterhin bestrebt sein, ein geeignetes Immortalisierungsverfahren für eine humane Osteoblastenzelllinie zu etablieren.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sind immortalisierte humane Osteoblasten charakterisiert worden. Diese Zellen sind mit dem Simian Virus 40 transformiert und anschließend mit der Bezeichnung THO-Zellen versehen worden. Wir haben verschiedene osteoblastentypische Aspekte untersucht, um eine Aussage bezüglich der Eigenschaften dieser Zellen treffen zu können.

Wir konnten belegen, daß die THO-Zellen ein für primäre Osteoblasten typisches Expressionsmuster hinsichtlich der Matrixproteine besitzen. Sie exprimieren in immunzytochemischen Antikörpertests das Bone Sialoprotein BSP I, Prokollagen I, Prokollagen III, Alkalische Phosphatase und Osteokalzin. Der in diesem Experiment geringe Osteokalzinnachweis wurde durch eine Northern-Analyse erneut gemessen und hier zeigte sich eine deutliche Osteokalzinexpression. Somit zeigen die THO-Zellen lediglich eine verminderte Expression von Bone sialoprotein BSP II im Vergleich zu primären Osteoblasten. Eine Bestimmung der normalerweise zur Charakterisierung gehörenden Parathormonrezeptorfunktion (PTH) mit der Bildanalyse war bei den THO-Zellen nicht möglich, da die apoptotischen THO-Zellen aufgrund zu niedriger Esteraseaktivität nicht in der Lage waren, den mit Ca^{2+} - bindenden Fluoreszenzfarbstoff (FURA 2 AM) aufzunehmen.

In anschließend durchgeführten Dehnungsversuchen zeigten die THO-Zellen mit einer Zunahme der Proliferationsrate von 30% bei einer Belastung von 3000 μstrain eine gute Mechanosensibilität. Primäre bovine Osteoblasten die als Kontrollgruppe dienten, zeigten eine Steigerung von 27%, wohingegen einige Tumorzelllinien (SaOS-2, HOS-MNNG und U-2 OS) eine deutliche Abnahme von 30%-40% bei der gleichen Belastung zeigten.

Da Jones et al., (1991) bereits den Anstieg der Ca^{2+} - Konzentration nach mechanischer Belastung mit der PLC-Aktivierung in Verbindung gebracht haben, lag es nahe, die THO-Zellen und ihr exprimiertes Isoenzymmuster mit anderen mechanosensiblen und nicht-mechanosensiblen Zellen zu vergleichen. Der wohl interessanteste Aspekt ist hier das Vorhandensein der beta 2-Form bei allen drei mechanosensiblen Zelllinien (POB's, THO und MG-63) und die Abwesenheit dieser Isoform bei nicht mechanosensiblen Zellen (SaOS-2). Die Vermutung liegt nahe, daß beta 2 bei der Signalkaskade in der Mechanotransduktion eine wichtige Rolle spielen könnte.

Mit diesen Ergebnissen schienen die THO's zunächst alle Erwartungen an eine immortalisierte und phänotypisch nicht veränderte osteoblastentypische Kultur zu erfüllen. Es war uns jedoch nicht möglich die THO-Zellen über die 26. Passage hinaus zu kultivieren, da bereits in der 16. Passage frühe Zeichen der Apoptose durch den PARP-Antikörper detektiert werden konnten. Somit eignen sich die Zellen nur eingeschränkt und in sehr frühen Passagen zu Experimenten, was sie nicht zu einem geeigneten Modell für die Untersuchung von intrazellulären Stoffwechselwegen in der Mechanotransduktion macht.

◆ Literaturverzeichnis

- ◆ Aarden, E.M., Burger E.H., Nijweide P.J. Function of osteocytes in bone. J. Cell. Biochem. 1994, Jul; 55,3: 287-299.
- ◆ Abendroth K., Der Osteoblast: Funktion und hormonelle Regulation. Aktuelle Aspekte der Osteologie, Springer Verlag Berlin, 1992, pg. 3-9.
- ◆ Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., 1995; Molekularbiologie der Zelle. 3. Auflage VCH Verlag.
- ◆ Andjelic S., Drappa J., Lacy E., Elkon K.B., Int. Immunol. 6, 73, 1995; Ogasawara J., Suda T., Nagata S. J. Exp. Med. 181, 485, 1995.
- ◆ Banga S., 1997; SEN6, a locus for SV40-mediated immortalization of human cells, maps to 6q26-27. Oncogene 14(3): 313-321.
- ◆ Bätge B. Seitzer und Müller P.K. 1993; Die organische Knochenmatrix, Kollagene und nichtkollagene Proteine; Osteologie Band 2, Heft 4, 193-201.
- ◆ Berridge M.J., Irvine R.F., 1984, Nature 312, 315-321.
- ◆ Bikel I., Loeken M.R., 1992. J.Virol. 66, 1489-1494.
- ◆ Billiau A., Edy V.G., Heremans H., Damme J., Desmyter J., Georgiades J.A., 1977; Human interferon: mass production in a newly established cell line (MG-63). Antimicrob. Agents Chemotherap. Vol 12, pg. 11-15.
- ◆ Brady J., Bolen J.B., Radonovich M., Salzman N., Khoury G., 1984. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 81, 2044-2044.
- ◆ Brighton C.T., Stratford B., Gross S.B. et al., 1991; The proliferative and synthetic response of isolated calvarial bone cells of rats to cyclic biaxial mechanical strain; J Bone Joint Surg (Am) 73:320-331.
- ◆ Buddecke E. Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin. De Gruyter Verlag, Berlin 1981:39.
- ◆ Burkhardt, R. Der Osteoblast – Schlüssel zum Verständnis des Skelettorgans. Osteologie 3, 1992: 139-151

- ◆ Burnette W.H., 1981, Western Blotting: Electrophoretic transfer of protein from SDS-PAGE to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein; Anal Biochem 112:195-203.
- ◆ Burr D.B., Milgrom C., Fyhrie D., Forward M., Nyska M., Finestone A., Sajag E., Simkin A., 1995; Human *in vivo* tibial strains during rigorous activity. Trans Orthop. Res. Soc. 20: 202.
- ◆ Burridge K., Fath K., Kelly T., Nuckolls G., Turner G., 1988; Focal adhesion: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton; Annu. Rev. Cell Biol. 4: 487-525.
- ◆ Caelles C., Helmberg A., Karin M., 1994; Nature Vol. 370, pg. 220-223.
- ◆ Camp M., Carozzi A., Schnabel P., Scheer A., Parker P.J. and Gierschik P., 1992; Nature 360, 684-686.
- ◆ Canalis E., Mc Carthy T., Centrella M., 1988. Growth factors and the regulation of bone remodeling. J. Clin Invest 81: 277-281.
- ◆ Capecchi, M.R., 1980; High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. Cell 22, 479-488.
- ◆ Caplan A.I., Pechak D.G., The cellular and molecular embryology of bone formation. Bone and Mineral Research/5, 1987:117.
- ◆ Chang S.E., 1986; *In vitro* immortalization of human epithelial cells. Biochim. Biophys. Acta 823, 161-194.
- ◆ Chang T.H. and Schlegel R., 1996; SV40 T antigen increases the expression and activities of p34cdc25, cyclin A and cyclin B prior to immortalization of human diploid fibroblasts. J. Cell. Biochem. 60, 161-172.
- ◆ Chen TL., Cohn CM., Morey-Holton E., Feldman D., 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptors in cultured rat osteoblast-like cells. L Biol Chem 258: 4350-4355.
- ◆ Chou J.Y., 1989; Differentiated mammalian cell lines immortalized by temperature-sensitive tumor viruses. Mol. Endocrinol. 3, 1511-1514.

- ◆ Christian B.J., Loretz L., Oberley T.D., and Reznikoff C.A., 1987; Charakterisation of human uroepithelial cells immortalized *in vitro* by simian virus 40. Cancer Res. 47, 6066-6073.
- ◆ Cohen J.J., Duke R.C., Fadok V.A., Sellins K.S., Annu. Rev. Immunol. 10, 267, 1992.
- ◆ Colbere-Garapin, F., Horodniceanu, F., Khourilsky, P., 1981; A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. J. Mol. Biol. 150, 1-14.
- ◆ Compton & Jones 1985 (Bradford); Mechanisms of dye response and interference in the Bradford protein assay. Anal Biochem 151: 369-374.
- ◆ Davidovitch Z., Shanfeld J., Montgomery E., Lally E., Laster L., Furst L., Korostoff E., 1984, Biochemical mediators of the effect of mechanical forces and electric currents on mineralized tissues; Calcif Tissue Int 36: S86-S97.
- ◆ Davidson R.M., Tatakis A.L., Auerbach D.W., 1990; Multiple forms of mechano-sensitiv ion channels in osteoblast-like cells; Pfluegers Arch 416: 646-651.
- ◆ Debatin K.M., et al., Blood 83, 3101, 1994
- ◆ Decker S. J. et al., J. Biol. Chem. 265: 7009-7015
- ◆ Dhaene K., Hubner R., Kumar-Singh S., Weyn B., Van Marck E., 1998; Telomerase activity in human pleural mesothelioma. Thorax 53(11), 915-918.
- ◆ Dickinson B., PharMingen Web Page, Apoptosis. Applied Reagents and Technologies, 1999, page 4.
- ◆ Dickman St., First p53 relative (p73) may be a new tumor suppressor. Science, 1997, Vol. 277, pg 1605-1606.
- ◆ Duncan R.L., Hruska K.A., 1994; Chronic intermittent loading alters mechanosensitive channel characteristics in osteoblast-like cells; Am J. Physiol. 267: F909-F916.
- ◆ Dyson N., Howley P.M., Munger K., Harlow E., 1989; The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science 243, 934-936.

- ◆ Eckert W.A., J Kartenbeck (Proteine: Standardmethoden der Molekular und Zellbiologie, Springer Verlag 1996.
- ◆ Elder, I.T., Spritz, R.A., and Weissman, S.M., 1981; Simian Virus 40 as a eukaryotic cloning vehicle. *Ann. Rev. Genet.* 15, 295-340.
- ◆ Elgin S.C.R., 1981. DNase-I-hypersensitive sites of chromatin. *Cell* 27, 413-415.
- ◆ Essen L.O., Perisic O., Cheung R., Katan M., Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C δ . *Nature* Vol 380, 595-602, 1996.
- ◆ Falk M.H. et al., *Blood* 79, 3300, 1992.
- ◆ Federman M., Nichols C.F., 1974; Bone cell cilia, vestigial or functional organelles?; *Calcif Tissue Res* 17: 81-85.
- ◆ Fiers W., Contreras R., Hägeman G., Rogiers R., van der Voorde, 1978. The complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature* 273, 113-120.
- ◆ Frisa P.S., Goodman M.N., Smith G.M., Silver J., and Jacobberger J.W., 1994; Immortalization of immature astrocytes by SV40 T-antigen. *J. Neurosci. Res.* 39, 47-56.
- ◆ Fujimori A., Cheng S., Avioli L.V., Civitelli R., 1992; Structure-function relationship of parathyroid hormone: Activation of phospholipase-C, protein kinase-A and-C in osteosarcoma cells; *Endocrinology* 130: 29-36.
- ◆ Furukawa T., Duguid W., Rosenberg L., Viallet J., Galloway D.A., and Tsao M.S., 1996; Long term culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic ducts transfected by the E6E7 gene of human papilloma virus 16. *Am. J. Pathol.*, 148, 1763-1770.
- ◆ Ghosh-Choudhury N., Harris M.A., Wozney J., Mundy G.R., Harris S.E., 1997; Clonal osteoblastic cell lines from p53 Null Mouse Calvariae are immortalized and dependent on BMP-2 for mature osteoblastic Phenotype. *Biochem. And Biophys. Res. Comm.* 231, 196-202.

- ◆ Goodman G.I., Eckert R.L., Utian W.H., and Rorke E.A., 1993; Establishment of and neurite outgrowth properties of neonatal and adult rat olfactory bulb glial cell lines. *Brain Res.* 619, 199-213.
- ◆ Graham FL, van der Eb A, 1973, Transfection by calcium phosphate precipitation. *Virology* 52: 456-466.
- ◆ Grigoriadis, A.E., Heersche, J.N.M. and Aubin, J.E. 1990; Continuously Growing Bipotential and Monopotential Myogenic, Adipogenic and Chondrogenic Subclones Isolated from the Multipotential RCJ 3.1 Clonal Cell Line. *Developmental Biology* 142: 313-318.
- ◆ Halbert C.L., Demers G.W., and Galloway D.A., 1991; The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol.* 65, 473-478.
- ◆ Hara H., and Kaji H., 1987; Random integration of SV40 in SV40-transformed, immortalized human fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* 168, 531-538.
- ◆ Harris C.C., 1987; Human tissues and cells in carcinogenesis research. *Cancer Res.* 47, 1-10.
- ◆ Harris S.A., Enger R.J., Riggs B.L., Spelsberg T.C., 1995; Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J. Bone Miner Res.* 10(2), 178-186.
- ◆ Hawley-Nelson P., Vousden K.H., Hubbert N.L., Lowy D.R., and Schiller J.T., 1989; HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize primary human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* 8, 3905-3910.
- ◆ Hicok K.C., Thomas T., Gori F., Rickard D.J., 1998; Development and characterization of conditionally immortalized osteoblast precursor cell lines from human bone marrow stroma. *J. Bone Miner Res.*, 13(2), 205-217.

- ◆ Hurlin P.J., Maher V.M., and McCormick J.J., 1989; Malignant transformation of human fibroblasts caused by expression of a transfected T24HRAS oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 187-191.
- ◆ Huschtscha L.I., and Holliday R., 1983; Limited and unlimited growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts. *J. Cell. Sci.* 63, 77.
- ◆ Irvine R., Taking stock of PI-PLC. *Nature* Vol.380, 1996, pg. 581-583.
- ◆ Itoh N. et al., *Cell* 66, 233, 1991.
- ◆ Jacobson M.D., Raff M.C., 1995; *Nature* Vol. 374, pg. 814-816.
- ◆ Jat P.S., and Sharp P.A., 1986; Large T antigen of simian virus 40 and polyomavirus efficiently establish primary fibroblasts. *J. Virol.* 59, 746-750.
- ◆ Jhon D.Y., Lee H., Park D., Yoo O. and Rhee S.G., 1993; *J.Biol.Chem.* 268, 6654-6661.
- ◆ Jones D.B., Scholübbbers J.G., Evidence that phospholipase C mediates the mechanical stress response in bone. *Calcif. Tissue Int.* 41, 1987, Suppl 2: 4.
- ◆ Jones D.B., Nolte H., Scholübbbers J.G., et al., 1991; Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells; *Biomat.*, Vol. 12:101-110.
- ◆ Jones D.B., Bingmann D. 1991; How do osteoblasts respond to mechanical stimulation? *Cells and Materials*, Vol. 1, No. 4: 329-340.
- ◆ Jones D.B., Leivseth G., Sawada Y., van der Sloten J., Bingman D., Application of homogenous, defined strains to cell cultures. 1993, in: *Society for experimental biology; seminar series 54: biomechanics and cells*. Adithor F. Lyall and A.J. El Haj. Cambridge University Press, pg. 197-219.
- ◆ Jones D.B., Leivseth G., Tenbosch J., 1995; Mechano-reception in osteoblast-like cells; *Biochem.Cell Biol.* 73:525-534.
- ◆ Jones K.A., Tjian R., 1984. *Cell* 36, 155-162.

- ◆ Joos U.E. 1989; In-vitro-Osteoinduktion durch verschiedene Cytokine: Untersuchungen an fibroblastischen Mesenchymzellen & Osteoblasten / Tübingen Univ.,Diss.
- ◆ Jost C.A., Marin M.C., Kaelin W.G., p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. 1997, Nature Vol. 389, pg. 191-194.
- ◆ Katakura Y., Alam S., Shirahata S., 1998; Immortalization by gene transfection. Methods Cell Biol. 57, 69-91.
- ◆ Katz S., Wu D., Simon M.I., 1992; Nature 360, 686-689.
- ◆ Kessler E., Takahara K., Biniaminov L.,Brusel M., Greenspan D.S., 1996; Bone morphogenetic protein-1 the type I prokollagen C-proteinkinase; Science 271:360-362.
- ◆ Kim H.K., Kim J.W., Zilberstein A., Margolis B., Schlessinger J., Rhee S.G., 1991; Cell 65, 435-441.
- ◆ Kim D., Jun K., Lee S., 1997; Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. Nature Vol. 389, 290-293.
- ◆ Kiyono T., Foster S.A., Koop J.I., McDougall J.K., Galloway D.A., Klingelhutz A.J., 1998; Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. Nature 396 (6706): 84-88.
- ◆ Klingelhutz A.J., Foster S.A., McDougall J.K., 1996; Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. Nature 380, 79-82.
- ◆ Kobayashi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 9620, 1990.
- ◆ Kritz R., Liu L., Sultzman L., Ellist C., Helcon C.H., 1991; J. CIBA Found.Symp., 150, 112-127.
- ◆ Kyhse-Andersen J., 1984 Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J Biochem. Biophys. Meth10:203-209.

- ◆ Lanyon L.E., Hampson W.G.J., Goodship A.E., Shah J.S., 1975; Bone deformation recorded *in vivo* from strain gauges attached to the human tibial shaft. Acta Orthop. Scand 46: 256-268.
- ◆ Lanyon L.E., 1984, Functional strain as a determinant for bone remodelling; Calcif Tissue Int 36: 556-561.
- ◆ Lee C.W., Park D.J. Lee K.H., Kim C.G., Rhee S.G., 1993; J.Biol.Chem. 268, 21318-21327.
- ◆ Lee S.B., Rhee S.G., Curr.Opin.Cell.Biol. 7, 183-189, 1995.
- ◆ Le Mellay V., Grosse B., Lieberherr M., J. Biol. Chem. 272, 11902-11907, 1997, Phospholipase C beta and Membrane action of calcitriol and estradiol.
- ◆ Lian J.B. et al., Studies of hormonal regulation of osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae. J.Biol. Chem. 260, 1985 : 8706-8710.
- ◆ Lilienfeld-Toal H.v., Wachstumsfaktoren und Knochenremodellierung. Aktuelle Aspekte der Osteologie, Springer Verlag Berlin, 1992, pg. 18-29.
- ◆ Lin H.Y., Lodish H.F., 1993; Receptors of the TGF β – superfamily: multiple polypeptides and serine/thyrosine kinases; Trends Cell Biol. 3: 14-19.
- ◆ MacDonald K.P.A., Mackay-Sim A., Bushell G.R., and Bartlett P.F., 1996; Olfactory neuronal cell lines generated by retroviral insertion of the n-myc oncogene display different developmental phenotypes. J. Neurosci. Res. 45, 237-247.
- ◆ Macnair R., Wilkinson C., C.McDonald et al., 1996, Cells and Materials, Vol.6, No.1-3, pages 71-78. Application of confocal Laser scanning Microscopy.
- ◆ Majerus P.W., 1992, Annu. Rev. Biochem. 61, 225-250.
- ◆ Margolis B., Rhee S.G., Felder S., Mervic G., Lyall R., Levitzki A., Ullrich A., Zilberstein A., Schlessinger J., 1989; Cell 57, 1101-1107.
- ◆ Mayer H., Scutt A. et al., 1992, Differenzierung von knochenbildenden Zellen: Systeme und Regulatoren; Z. Orthop. 130; 276-284; Enke Verlag.

- ◆ McKay R., 1988; Where do different neurons come from? Identification and immortalization of CNS precursor cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 540, 47-51.
- ◆ Meisenhelder J., Suh P., Rhee S.G., Hunter T., 1989; *Cell.* 57, 1109-1122.
- ◆ Melsen F., Steiniche T., Bone Remodeling in Normal and Diseased Conditions, *Aktuelle Aspekte der Osteologie*, Springer Verlag Berlin, 1992, pg. 30-35.
- ◆ Merke J., Klaus G., Hügel U., Waldherr R., Ritz E., 1986, No 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ receptors on osteoclasts of calcium-deficient chickens despite demonstrable receptors on circulating monocytes. *J Clin Invest* 77: 312-314.
- ◆ Morris G.F., Mathews M.B., 1991; The adenovirus E1A transforming protein activates the proliferating cell nuclear antigen via an activating transcription factor site. *J. Virol.* 65, 6397-6406.
- ◆ Morrison D.K., Kaplarr D.R., Rhee S.G., Williams L.T., 1990; *Mol.Cell.Biol.* 10, 2359-2366.
- ◆ Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunolog.Meth.*, **65**, 55-63
- ◆ Mougneau E., Lemieux L., Rassoulzadegan M., and Cuzin F., 1984; Biological activities of v-myc and rearranged c-myc oncogenes in rat fibroblast cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5758-5762.
- ◆ Möller P. et al., *ibid.* 81, 2067, 1993.
- ◆ Munger K., Phelps W.C., Bubb V., Howley P.M., and Schlegel R., 1989; The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* 63, 4417-4421.
- ◆ Nagata S., *Adv. Immunol.* 57, 129, 1994; Nagata S. und Suda I., *Immunol. Today* 16, 39, 1995.
- ◆ Nagata S. et al., Apoptosis by Death Factor. 1997; *Cell.* Vol. 88, pg. 355-365.

- ◆ Nakashima S., et al., Biochem.biophys. Res.Communic. 211, 364-369, 1995.
- ◆ Nevins J.R., 1992; E2F: A link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. Science 258, 424-429.
- ◆ Ningshu L., Kiyoko F., Haiyan Y., Tadaomi T., 1996, A new phospholipase C $\delta 4$ is induced at S-phase of the cell cycle and appears in the nucleus. J. Biol. Chem. Vol. 271, No 1, pg 355-360.
- ◆ Nishizuka Y., 1984, Nature 308, 693-698.
- ◆ Nomoto K., Tomita N., Miyake M., 1995; Expression of PLC gamma 1, beta 1 and delta 1 in primary human colon carcinomas and colon carcinoma cell lines. Mol. Carcin. 12: 146-152.
- ◆ Oda D., Bigler L., Lee P., and Blanton R., 1996; HPV immortalization of human oral epithelial cells: a model for carcinogenesis. Exp. Cell Res. 226, 164-169.
- ◆ Oehm A. et al., J. Biol. Chem. 267, 10709, 1992.
- ◆ Oldberg A. Franzen A. et al., Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein cDNA reveals an Arg-Gly-Asp. Cell-binding sequence. Proc. Natl. Acad. Sci.83,1986 :8819-8823.
- ◆ Oyajobi B.O., Lomri A., Hott M., Marie P.J., 1999; Isolation and characterization of human clonogenic osteoblast progenitors immunoselected from fetal bone marrow stroma using STRO-1 monoclonal antibody. J. Bone Miner Res. 14(3), 351-361.
- ◆ Polyak K., Yong X., Zweier J.L., Kinzler K.W. Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. 1997; Nature, Vol. 389, pg. 300-305.
- ◆ Prince C.W.; Butler W.T.; 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the biosynthesis of osteopontin, a bone derived cell attachment protein.; Clonal Osteoblast-like Osteosarkoma cells. Collagen Rel. Res.7,1987:305-313.
- ◆ Raff M.C., Nature 356, 397, 1992; Walker N.I., Harmon B.V., Gobe G.C., Kerr J.F.R., Methods Achiev. Exp. Pathol. 13, 18, 1988; Wyllie A.H., Kerr J.F.R., Currie A.R., Int. Rev. Cytol. 68, 251, 1980.
- ◆ Raff M.C. et al., 1993, Science 262, 695.

- ◆ Reddel R.R., Yang K., Gerwin B.I., McMenamin M.G., Lechner J.F., Su R.T., 1988; Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus 12-SV40 hybrid virus, or transformation via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res.* 48, 1904-1909.
- ◆ Reddy V.B., Thimmappaya B., Dhar R., Subramanian K.N., Zain B.S., Pan J., Ghosh P.K., 1978. The genom of simian virus 40. *Science* 200, 494-502.
- ◆ Reich K.M., Gay C.V., Frangos J.A. 1990. Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production; *J. Cell Physiol.* 143: 100-104.
- ◆ Reichel H., Endokrine und parakrine Wirkungen von 1,25(OH)₂D₃. Aktuelle Aspekte der Osteologie, Springer Verlag Berlin; 1992, pg. 24-29.
- ◆ Reznikoff C.A., Yeager T.R., Belair C.D., Savelieva E., 1996; Elevated p16 at senescence and loss at p16 at immortalization in human papillomavirus 16 W6, but not E7, transformed human uroepithelial cells. *Cancer Res.* 56, 2886-2890.
- ◆ Rhee S.G., Suh P.G., Ryu S.H., Lee S.Y., 1989; *Science*, 244, 546-550.
- ◆ Rio D., Robbins A., Myers R., Tjian R., 1980. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 77, 5706-5710.
- ◆ Rodan, G.A., Martin T.J., Role of Osteoblasts in hormonal control of bone resorption-a hypothesis. *Calcif. Tissue Int.* 33, 1991: 349-351.
- ◆ Rosenthal D., Smulson M., PARP Cleavage and Apoptosis, *BioRadiations*, Number 99, page 7-9.
- ◆ Rouvier E., Luciani M.F., Golstein P., *J. Exp. Med.* 177, 195, 1993.
- ◆ Ruley H.E., 1983; Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* 304, 602-606.

- ◆ Saragosti S., Moyne G., Yaniv M., 1980. Absence of nucleosomes in a fraction of SV40 chromatin between the origin of replication and the region coding for the late leader RNA. *Cell* 20, 65-73.
- ◆ Sassone-Corsi P., and Borrelli E., 1987; Promoter transactivation of protooncogenes c-fos and c-myc, but not c-Ha-ras, by products of adenovirus early region 1A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- ◆ Satir P., Sleight M.A., 1990; The physiology of cilia and mucociliary interactions; *Annu Rev Physiol* 52: 137-155.
- ◆ Scangos, G., and Ruddle, F.H., 1981; Mechanisms and applications of DNA mediated gene transfer in mammalian cells; a review. *Gene* 14, 1-10.
- ◆ Scheffner M., 1990; The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63(6), 1129-1136.
- ◆ Sedman S.A., 1992; Mutant p53 can substitute for human papillomavirus type 16E6 in immortalization of human Keratinocytes but does not have E6 associated trans-activation or transforming activity. *J. Virol.* 66(7), 4201-4208.
- ◆ Shenk T.E., Carbon J., Berg P., 1976. *J. Virol.* 18, 664-671.
- ◆ Shimizu S., et al., 1995; *Nature* Vol. 374, pg. 811-813.
- ◆ Siddhanti S.R., Quarles L.D. Molecular to pharmacologic control of osteoblasts proliferation and differentiation. *J. Cell.Biochem.* 1994, Jul;55,3: 310-320.
- ◆ Silbernagel S., Despopoulos A., 1991, *Endokrines System und Hormone, Taschenatlas der Physiologie*, Thieme Verlag, pg 232-271.
- ◆ Simon M.C., 1987; Selective induction of human heat shock gene transcription by the adenovirus E1A gene products, including the 12SE1A product. *Mol. Cell. Biol.* 7(8), 2884-2890.
- ◆ Sladek T.L., and Jacobberger, 1992; Dependence of SV40 large T-antigen cell cycle regulation on T-antigen expression levels. *Oncogene.* 7(7): 1305-1313.

- ◆ Slovik D.M., Rosenthal D.I., Doppelt S.H., Potts J.T., 1986, Restoration of spinal bone in osteoporotic men by treatment with human parathyroid hormone (1-34) and 1,25-dihydroxyvitamin D; J of Bone and Mineral Res 1: 377-382.
- ◆ Smith E.L., Reddan W., Smith P.E., 1981; Physical activity and calcium modalities for bone mineral increase in aged women. Med. Sci. Sports Exerc. 13(1), 60-64.
- ◆ Smith E.L., Raab D.M., 1986; Osteoporosis and physical activity. Acta. Med. Scand. Suppl. 711: 149-156.
- ◆ Smith E.L., Gilligan C., 1996; Dose-response relationship between physical loading and mechanical competence of bone. Bone 18 (1): 455-505.
- ◆ Smrcka A.V., Helper J.R., Brown K.O., Sternweis P.C., 1991; Science 251, 804-807.
- ◆ Somerman M.J.et al., Mechanism of fibroblast attachment to bone extracellular matrix: role of a 44 kd bone phosphoprotein. J. Bone Min. Res.2,1987: 259-265.
- ◆ Southern, P.J., and Berg, P., 1982; Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 Early Region Promotor. J. Mol. Appl. Genet. 1, 327-341.
- ◆ Srinivasan A., et al., 1989, The large tumor antigen of simian virus 40 encodes at least two distinct transforming functions. J. Virol., 63 (12) : 5459-63.
- ◆ Stanbridge E. J. et al., Identifying tumor suppressor genes in human colorectal cancer. Science 1990, 247 (4938): 12-30. Review.
- ◆ Steller H., Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. 1995, Science Vol. 267, pg. 1445-1456.
- ◆ Stoppler M.C., 1996; The E5 gene of HPV-16 enhances Keratinocyte immortalization by full-length DNA. Virology 223(1), 251-254.
- ◆ Stevens A. and Lowe J., Histologie, VCH Verlagsgesellschaft, 1992, Seite 233-248.

- ◆ Suda T., Takahashi T., Golstein P., Nagata S., Molecular cloning and expression of Fas ligand: a novel member of the tumor necrosis factor family. 1993, Cell 75, pg. 1169-1178.
- ◆ Suh P. G. et al., J. Biol. Chem. 263: 14497-14504, 1988
- ◆ Sutton R.B., Davletov B.A., Südhof T.C., Sprang S.R., 1995, Cell 80, 929-938.
- ◆ Tavis J.E., Frisque R.J., 1991, Virology 183, 239-250.
- ◆ Taylor S.J., Chae H.Z., Rhee S.G., Exton J., 1991; Nature 350, 510-518.
- ◆ Trauth B.C. et al., Science 245, 301, 1989.
- ◆ Tsutsui T., Tanaka Y., Matsudo Y., Hasegawa K., Fujino T., 1997; Extended lifespan and immortalization of human fibroblasts induced by X-ray irradiation. Mol. Carcinogen. 18, 7-18.
- ◆ Turner C.H., Forwood M.R., Otter M.W., 1994 Mechanotransduction in bone: do bone cells act as sensor of fluid flow?; FASEB J. 8: 875-878.
- ◆ Urist M.R., Lietze A., 1979; Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein; PNAS 76. No.4: 1828-1832.
- ◆ Van der Plas A., Feyen J.H.M., Nijweide P.J., 1985, Direct effect of parathyroid hormone on the proliferation of osteoblast-like cells: a possible involvement of cyclic AMP; Biochem Biophys Res Commun 129: 918-925.
- ◆ Varshavsky A.J., Sundin O.H., Bohn M., 1979. A stretch of late SV40 viral DNA about 400 bp long which includes the origin of replication is specifically exposed in SV40 minichromosomes. Cell 16, 453-466.
- ◆ Versteeg R. et al., 1995, 1p36: every subband a suppressor? Eur. J. Cancer 31A, pg. 538-541.
- ◆ Wahl M.I., Nishibe S., Suh P.G., Rhee S.G., Carpenter G., 1989; Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86, 1568-1572.
- ◆ Waldman T., Kinzler K., et al., 1995; p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. Cancer Res. 55, 5187-5190.

- ◆ Watanabe-Fukunaga R. et al., J. Immunol. 148, 1274, 1992.
- ◆ Watson P.A., 1991; Function follows form: generation of intracellular signals by cell deformation; FASEB J. 5: 2013-2019.
- ◆ Weisbrod S., 1982. Active chromatin. Nature 297, 289-295.
- ◆ Whitefield J.F., Boynton A.L., MacManus P., Skorska M., Tsang B.K., 1979; The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP; Mol Cell Biochem 27: 155-179.
- ◆ Whitson S.W. et al., Fetal bovine bone cells synthesize bone specific matrix proteins. J. Cell Biol., 1984, 99 (2): 607-614.
- ◆ Winnacker E.L., Gene und Klone, VCH Verlag, 1990, SV40 das Affenvirus. Pg 270-308.
- ◆ Wlodarski K.H. Properties and Origin of Osteoblasts. Clin. Orthop.252, 1990 : 276-293, Review.
- ◆ Wolff J., 1869, Über die Bedeutung der Architektur der spongiösen Substanzen; Zentralblatt für medizinische Wissenschaft VI Jg.:223-234.
- ◆ Wyllie A., Clues in the p53 murder mystery. Nature, 1997, Vol. 389, pg 237/238.
- ◆ Yonehara S., Ishii A., Yonehara M., J. Exp. Med. 169, 1747, 1989.
- ◆ Zini N., Mazzoni M., Neri L., Bavelloni A., Marmioli S., et al., 1994; Immunocytochemical detection of the specific association of different PLC isiforms with cytoskeletal and nuclear matrix compartments in PC12 cells. European Journal of Cell Biol. 65; 206-213.
- ◆ Zou H., et al., 1997, Cell 90, 405-413.

1.

◆ Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Amon, Arnold, Aumüller, Basler, Bauer, Baum, Berger, Friederich, Fuhrmann, Ganz, Garten, Gemsa, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Gröne, Haberich, Happle, Havemann, Heß, Hildebrandt, Hilgermann, Huffmann, Jacob, Jones, Joseph, Kaffarnik, Karlson, Kern, Kleine, Klose, Knoll, Kretschmer, Kroll, Kummer, Lang, Lange, Lennartz, Maisch, Mannheim, Mennel, Moll, Müller, Netter, Neurath, Riedmiller, Rothmund, Schäfer, Schachtschabel, Schwarz, Seifart, Slenczka, Strempel, Sturm, Thomas, Voigt, Weber, von Wichert, Wiegandt, Zelder.

◆ Danksagung:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik der Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. David Jones Ph.D.M.I.Biol von April 1996 bis August 1999 angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. David Jones herzlich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, sowie für die freundliche Unterstützung bei der Lösung entstandener Probleme und für die Förderung meiner Promotion.

Besonderer Dank gilt der Betreuung durch Dr. Jochen Tenbosch für seine zahlreichen Hilfestellungen, die mir den Einstieg in das Thema sehr erleichterten. Sein Einsatz und seine Anregungen trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Mein Dank gilt auch meinen Freunden und Kommilitonen Jürgen Leitsch und Arndt Guntermann für eine beispiellos gute Zusammenarbeit, ein super Arbeitsklima und die ständige Bereitschaft mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, sowie den Mitarbeitern der Zellbiologie der Abteilung für die wertvolle Unterstützung.